

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040631**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.07.07

(21) Номер заявки
201890571

(22) Дата подачи заявки
2016.08.25

(51) Int. Cl. **A61K 31/7115** (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

**(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЯ,
АССОЦИИРОВАННОГО С ГЕНОМ ПРОПРОТЕИНКОНВЕРТАЗЫ
СУБТИЛИЗИН/КЕКСИНОВОГО ТИПА (PCSK9)**

(31) **62/209,526**

(32) **2015.08.25**

(33) **US**

(43) **2018.10.31**

(86) **PCT/US2016/048666**

(87) **WO 2017/035340 2017.03.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭЛНИЛЭМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
Фитцджеральд Кевин (US)

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

(56) Kevin Fitzgerald: "A Subcutaneous, Potent and Durable RNAi Platform Targeting Metabolic Diseases, Genes PCSK9, ApoCIII and ANGPTL3", 1 March 2014 (2014-03-01), XP055314837, Retrieved from the Internet: URL:<http://www.alnylam.com/web/assets/ALNY-CardioMetabolicPrograms-ATVB-May2014.pdf> pages 3-11 August: "RNAi Roundtable: ALN-PCSSc for the Treatment of Hypercholesterolemia", 1 January 2014 (2014-01-01), XP055314824, Retrieved from the Internet: URL:http://www.alnylam.com/web/assets/RNAi-Roundtable_PCSsc_081414.pdf pages 1, 39-55

Anna Borodovsky: "Abstract 11936: Development of Monthly to Quarterly Subcutaneous Administration of RNAi Therapeutics Targeting the Metabolic Diseases Genes PCSK9, ApoC3 and ANGPTL3 Circulation", 25 November 2014 (2014-11-25), XP055314834, Retrieved from the Internet: URL:http://circ.ahajournals.org/content/130/Suppl_2/A11936 [retrieved on 2016-10-28] the whole document

WO-A1-2014089313

Kevin Fitzgerald ET AL.: "Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1

trial", 3 October 2013 (2013-10-03), XP055314131, Retrieved from the Internet: URL:http://ac.els-cdn.com/S0140673613619145/1-s2.0-S0140673613619145-main.pdf?tid=934e5128-9b71-lle6-b0c6-00000aacb35d&acdnat=1477482458_13f4512706bde225e2895b7dd2029d6 [retrieved on 2016-10-26] abstract

Kevin Fitzgerald ET AL.: "A Subcutaneously Administered Investigational RNAi Therapeutic (ALN-PCSSc), Targeting PCSK9 for the Treatment of Hypercholesterolemia: Initial Phase 1 Study Results D", 30 August 2015 (2015-08-30), XP055314809, Retrieved from the Internet: URL:http://www.alnylam.com/web/assets/ALN-PCSSc-Phase-1_Presentation_08302015.pdf [retrieved on 2016-10-28] pages 1-23 -& Anonymous: "Positive Initial Clinical Data from Phase 1 Trial with ALN-PCSSc - Alnylam", 30 August 2015 (2015-08-30), XP55314896, Retrieved from the Internet: URL:http://www.alnylam.com/capell_a/presentations/positive-initial-phase-1-data-aln-pcssc-esc2015/ [retrieved on 2016-10-28] the whole document

Kevin Fitzgerald ET AL.: "ALN-PCSSc, an RNAi Investigational Agent That Inhibits PCSK9 Synthesis With the Potential for Effective Bi-Annual Dosing: Interim Results", 11 November 2015 (2015-11-11), XP055314803, Retrieved from the Internet: URL:http://www.alnylam.com/web/assets/AHA_PCS-Ph-1_111115.pdf [retrieved on 2016-10-28] pages 1-19 -& Anonymous: "New Clinical Data from Phase 1 Trial with ALN-PCSSc Confirms Potential for Bi-Annual Dosing - Alnylam", 11 November 2015 (2015-11-11), XP55314805, Retrieved from the Internet: URL:http://www.alnylam.com/capell_a/presentations/data-from-phase-1-trial-with-aln-pcssc-confirms-potential-for-bi-annual-dosing/ [retrieved on 2016-10-28] abstract

Anonymous: "ALN-PCS in healthy volunteers: The NCT02314442 study (phase I)", 29 August 2015 (2015-08-29), XP055314190, Retrieved from the Internet: URL:https://integrity.thomson-pharma.com/integrity/xmlxsl/pk_csl_list.xml_csl_ref_popup_pr?p_origen=QCK&p_tsearch=&p_order=&p_type=FICHA&p_sess_index=973191&p_id=305219 [retrieved on 2016-10-26] abstract

(57) Изобретение относится к способам ингибирования экспрессии гена PCSK9 у субъекта, а также к терапевтическим и профилактическим способам для лечения субъектов, у которых имеется нарушение липидного обмена, такое как гиперлипидемия, с применением RNAi-средств, например двухнитевых RNAi-средств, нацеливающихся на ген PCSK9.

040631 B1

040631 B1

Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 62/209526, поданной 25 августа 2015 года, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Данная заявка является родственной предварительной заявке на патент США № 61/733518, поданной 5 декабря 2012 года; предварительной заявке на патент США № 61/793530, поданной 15 марта 2013 года; предварительной заявке на патент США № 61/886916, поданной 4 октября 2013 года; предварительной заявке на патент США № 61/892188, поданной 17 октября 2013 года; заявке согласно РСТ № РСТ/US2013/073349, поданной 5 декабря 2013 года; и заявке на патент США № 14/650128, поданной 5 июня 2015 года. Полное содержание каждой из вышеупомянутых заявок на патент настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная ASCII-копия, созданная 24 августа 2016 года, имеет название 121301-04420_SL.txt, и ее размер составляет 188218 байт.

Уровень техники

Пропропротеинконвертаза субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9) является представителем семейства субтилизиновых сериновых протеаз. Другие восемь субтилизиновых протеаз млекопитающих, PCSK1-PCSK8 (также называемых PCI/3, PC2, фурин, PC4, PC5/6, PACE4, PC7 и S1P/SKI-1), представляют собой пропротеинконвертазы, которые превращают широкий спектр белков секреторного пути и играют роль в различных биологических процессах (Bergeron, F. (2000) *J. Mol. Endocrinol.* 24, 1-22, Gensberg, k., (1998) *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 11-17, Seidah, N. G. (1999) *Brain Res.* 848, 45-62, Taylor, N. A., (2003) *FASEB J.* 17, 1215-1227, и Zhou, A., (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 20745-20748).

Выдвигалось предположение, что PCSK9 играет роль в метаболизме холестерина. Экспрессия мРНК PCSK9 подавлялась у мышей при скармливании им рациона на основе холестерина (Maxwell, K. N., (2003) *J. Lipid Res.* 44, 2109-2119), активировалась под действием статинов в клетках HepG2 (Dubuc, G., (2004) *Arterioscler Thromb. Vase. Biol.* 24, 1454-1459) и активировалась у мышей, трансгенных по белкам, связывающим стеролрегулирующие элементы (SREBP) (Horton, J. D., (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 12027-12032), аналогично ферментам, участвующими в биосинтезе холестерина, и рецептору липопротеинов низкой плотности (LDLR). Кроме того, было обнаружено, что миссенс-мутации в PCSK9 ассоциированы с формой аутосомно-доминантной гиперхолестеринемии (Hchola3) (Abifadel, M., et al. (2003) *Nat. Genet.* 34, 154-156, Timms, K. M., (2004) *Hum. Genet.* 114, 349-353, Leren, T. P. (2004) *Clin. Genet.* 65, 419-422). PCSK9 может также играть роль в определении уровней холестерина LDL в общей популяции, поскольку была обнаружена ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) с уровнями холестерина у населения Японии (Shioji, K., (2004) *J. Hum. Genet.* 49, 109-114).

Типы аутосомно-доминантной гиперхолестеринемии (ADH) являются моногенными заболеваниями, при которых у пациентов наблюдаются повышенные уровни общего холестерина и холестерина LDL, сухожильные ксантомы и ранний атеросклероз (Rader, D. J., (2003) *J. Clin. Invest.* 111, 1795-1803). Патогенез типов ADH и рецессивной формы, аутосомно-рецессивной гиперхолестеринемии (ARH) (Cohen, J. C., (2003) *Curr. Opin. Lipidol.* 14, 121-127), объясняется нарушениями поглощения LDL печенью. Причиной ADH могут быть мутации в LDLR, что предотвращает поглощение LDL, или мутации в белке на LDL, аполипопротеине В, который связывается с LDLR. Причиной ARH являются мутации в белке ARH, который необходим для эндоцитоза комплекса LDLR-LDL посредством его взаимодействия с клатрином. Таким образом, если мутации в PCSK9 вызывают заболевания из семейства Hchola3, то, вероятно, PCSK9 играет роль в опосредованном рецептором поглощении LDL.

Исследования по сверхэкспрессии указывают на роль PCSK9 в регуляции уровней LDLR и, таким образом, поглощении LDL печенью (Maxwell, K. N. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7100-7105, Benjannet, S., et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 48865-48875, Park, S. W., (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 50630-50638). Опосредованная аденовирусом сверхэкспрессия PCSK9 мыши или человека у мышей в течение 3 или 4 дней приводила к повышенным уровням общего холестерина и холестерина LDL; при этом данный эффект не наблюдался у нокаутных по LDLR животных (Maxwell, K. N. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7100-7105, Benjannet, S., et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 48865-48875, Park, S. W., (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 50630-50638). Кроме того, сверхэкспрессия PCSK9 приводила к сильному снижению уровня белка печеночных LDLR, не оказывая влияния на уровни мРНК LDLR, уровни белка SREBP или отношение ядерного к цитоплазматическому белку SREBP.

Несмотря на то, что гиперхолестеринемия сама по себе является бессимптомной, длительное повышение уровня холестерина в сыворотке крови может приводить к атеросклерозу. Хронически повышенный в течение десятилетий уровень холестерина в сыворотке крови способствует образованию атеросклеротических бляшек в артериях, что может привести к прогрессирующему стенозу или даже к полной окклюзии вовлеченных артерий. Кроме того, более мелкие бляшки могут отрываться, и при этом вызывать образование тромба и перекрывать ток крови, приводя, например, к инфаркту миокарда и/или инсульту. Если образование стеноза или окклюзии является постепенным, то кровоснабжение тканей и органов уменьшается медленно до тех пор, пока не функции органа не становятся нарушенными.

Соответственно, в данной области существует потребность в эффективных средствах лечения PCSK9-ассоциированных заболеваний, таких как гиперлипидемия, например, гиперхолестеринемия.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на неожиданном обнаружении того, что однократная доза двухнитевого RNAi-средства, содержащего химические модификации, демонстрирует исключительную эффективность и продолжительность действия в отношении ингибирования экспрессии PCSK9. Конкретно, однократная фиксированная доза, например фиксированная доза, составляющая от приблизительно 300 мг до приблизительно 500 мг RNAi-средств, нацеливающихся на ген PCSK9 человека, например, нуклеотиды 3544-3623 гена PCSK9 человека (нуклеотиды 3544-3623 из SEQ ID NO:1), например, нуклеотиды 3601-3623 из SEQ ID NO:1, содержащих лиганд GalNAc, как показано в данном документе, является исключительно эффективной и длительно действующей в отношении подавления активности гена PCSK9.

Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены способы ингибирования экспрессии гена PCSK9 у субъекта и способы лечения субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие ингибирование или снижение экспрессии гена PCSK9, например, нарушение, опосредованное экспрессией PCSK9, такое как гиперлипидемия, например гиперхолестеринемия, с применением композиций на основе iRNA, которые осуществляют опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена PCSK9.

В одном аспекте способы ингибирования экспрессии гена PCSK9 у субъекта и способы лечения субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие ингибирование или снижение экспрессии гена PCSK9, например, нарушение, опосредованное экспрессией PCSK9, такое как гиперлипидемия, например гиперхолестеринемия, по настоящему изобретению предусматривают введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 800 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:2, где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, и где смысловая нить конъюгирована с лигандом, прикрепленным к 3'-концу.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы ингибирования экспрессии гена PCSK9 у субъекта. Способы предусматривают введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 800 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 3544-3623 из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1, вследствие чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена PCSK9 у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы снижения уровня липопротеинов низкой плотности (LDLc) у субъекта, предусматривающие введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 800 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 3544-3623 из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1, вследствие чего обеспечивается снижение уровня LDLc у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9. Способы включают введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 800 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 3544-3623 из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1, за счет чего осуществляется лечение субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется гиперлипидемия. Способы включают введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 800 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности,

который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 3544-3623 из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1, за счет чего осуществляется лечение субъекта, у которого имеется гиперхолестеринемия.

Фиксированную дозу можно вводить субъекту с интервалом один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц, один раз в квартал или два раза в год.

В одном варианте осуществления субъекту вводят фиксированную дозу, составляющую от приблизительно 25 мг до приблизительно 50 мг, один раз в неделю. В другом варианте осуществления субъекту вводят фиксированную дозу, составляющую от приблизительно 50 мг до приблизительно 100 мг, один раз в две недели. В другом варианте осуществления субъекту вводят фиксированную дозу, составляющую от приблизительно 100 мг до приблизительно 200 мг, один раз в месяц. В еще одном варианте осуществления субъекту вводят фиксированную дозу, составляющую от приблизительно 300 мг до приблизительно 800 мг, один раз в квартал. В другом варианте осуществления субъекту вводят фиксированную дозу, составляющую от приблизительно 300 мг до приблизительно 800 мг, два раза в год.

В настоящем изобретении также предусмотрены способы, при которых RNAi-средство вводят согласно схеме дозирования, которая включает фазу насыщения и фазу поддержания.

Соответственно, в одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы ингибирования экспрессии гена PCSK9 у субъекта. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) согласно схеме дозирования, которая включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания, где фаза насыщения предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг RNAi-средства, и где фаза поддержания предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 100 мг RNAi-средства, приблизительно один раз в месяц, где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 3544-3623 из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1, вследствие чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена PCSK9 у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы снижения уровня липопротеинов низкой плотности (LDLc) у субъекта. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) согласно схеме дозирования, которая включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания, где фаза насыщения предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг RNAi-средства, и где фаза поддержания предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 100 мг RNAi-средства, один раз в месяц, где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 3544-3623 из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1, вследствие чего обеспечивается снижение уровня LDLc у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) согласно схеме дозирования, которая включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания, где фаза насыщения предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг RNAi-средства, и где фаза поддержания предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 100 мг RNAi-средства, один раз в месяц, где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 3544-3623 из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1, за счет чего осуществляется лечение субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется гиперлипидемия. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) согласно схеме дозирования, которая включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания, где фаза насыщения предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг RNAi-средства, и где фаза поддержания предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 100 мг RNAi-средства, один раз в месяц, где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 3544-3623 из нуклеотидной

последовательности под SEQ ID NO:1, за счет чего осуществляется лечение субъекта, у которого имеется гиперлипидемия.

Двухнитевое RNAi-средство можно вводить субъекту подкожно, например, путем подкожной инъекции, или внутримышечно.

В одном варианте осуществления антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любых немодифицированных нуклеотидных последовательностей, представленных в табл.1. В одном варианте осуществления двухнитевое RNAi-средство нацеливается на нуклеотиды 3601-3623 из SEQ ID NO:1. В одном варианте осуществления средство, нацеливающееся на нуклеотиды 3601-3623 из SEQ ID NO:1, представляет собой AD-60212.

В одном варианте осуществления антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3' (SEQ ID NO: 685).

В одном варианте осуществления смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3' (SEQ ID NO: 686).

В одном варианте осуществления средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для RNAi содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

В одном варианте осуществления значительная часть нуклеотидов смысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В другом варианте осуществления практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В еще одном варианте осуществления значительная часть нуклеотидов смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В другом варианте осуществления все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В еще одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы ингибирования экспрессии гена PCSK9 у субъекта. Способы включают введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 800 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3' (SEQ ID NO: 685), а смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3' (SEQ ID NO: 686), где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, вследствие чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена PCSK9 у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы снижения уровня липопротеинов низкой плотности (LDLc) у субъекта. Способы включают введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 800 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3' (SEQ ID NO: 685), а смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3' (SEQ ID NO: 686), где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, вследствие чего обеспечивается снижение уровня LDLc у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9, предусматривающие введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 800 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-ACAAAAGCAAAAACAGGUCUAGAA-3' (SEQ ID NO: 685), а смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3' (SEQ ID NO: 686), где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, за счет чего осуществляется лечение субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется гиперлипидемия. Способы включают введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 800 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-ACAAAAGCAAAAACAGGUCUAGAA-3' (SEQ ID NO: 685), а смысловая нить содержит нуклеотидную

последовательность 5'-CUAGACCUGUTUUGCUIUUUGU-3' (SEQ ID NO: 686), где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, за счет чего осуществляется лечение субъекта, у которого имеется гиперлипидемия.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы ингибирования экспрессии гена PCSK9 у субъекта. Способы включают введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 800 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3' (SEQ ID NO: 685), а смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-CUAGACCUGUTUUGCUIUUUGU-3' (SEQ ID NO: 686), где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, и введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к PCSK9 или его антигенсвязывающего фрагмента, вследствие чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена PCSK9 у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы снижения уровня липопротеинов низкой плотности (LDLc) у субъекта. Способы включают введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 800 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3' (SEQ ID NO: 685), а смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-CUAGACCUGUTUUGCUIUUUGU-3' (SEQ ID NO: 686), где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, и введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к PCSK9 или его антигенсвязывающего фрагмента, вследствие чего обеспечивается снижение уровня LDLc у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9, предусматривающие введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 800 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-ACAAAAGCAAAAACAGGUCUAGAA-3' (SEQ ID NO: 685), а смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-CUAGACCUGUTUUGCUIUUUGU-3' (SEQ ID NO: 686), где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, и введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к PCSK9 или его антигенсвязывающего фрагмента, за счет чего осуществляется лечение субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется гиперлипидемия. Способы включают введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 2,5 мг до приблизительно 800 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA - 3' (SEQ ID NO: 685), а смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-CUAGACCUGUTUUGCUIUUUGU-3' (SEQ ID NO: 686), где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, и введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к PCSK9 или его антигенсвязывающего фрагмента, за счет чего осуществляется лечение субъекта, у которого имеется гиперлипидемия.

Фиксированную дозу можно вводить субъекту с интервалом один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц, один раз в квартал или два раза в год.

В одном варианте осуществления субъекту вводят фиксированную дозу, составляющую от приблизительно 25 мг до приблизительно 50 мг, один раз в неделю. В другом варианте осуществления субъекту вводят фиксированную дозу, составляющую от приблизительно 50 мг до приблизительно 100 мг, один раз в две недели. В другом варианте осуществления субъекту вводят фиксированную дозу, составляющую от приблизительно 100 мг до приблизительно 200 мг, один раз в месяц. В еще одном варианте осуществления субъекту вводят фиксированную дозу, составляющую от приблизительно 300 мг до приблизительно 800 мг, один раз в квартал. В другом варианте осуществления субъекту вводят фиксированную дозу, составляющую от приблизительно 300 мг до приблизительно 800 мг, два раза в год.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы ингибирования экспрессии гена PCSK9 у субъекта. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) согласно схеме дозирования, которая включает фазу насыщения с последующей

смысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, и введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к PCSK9 или его антигенсвязывающего фрагмента, вследствие чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена PCSK9 у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы снижения уровня липопротеинов низкой плотности (LDLc) у субъекта. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) согласно схеме дозирования, которая включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания, где фаза насыщения предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг RNAi-средства, и где фаза поддержания предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 100 мг RNAi-средства, один раз в квартал, где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3' (SEQ ID NO: 685), а смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3' (SEQ ID NO: 686), где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, и введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к PCSK9 или его антигенсвязывающего фрагмента, вследствие чего обеспечивается снижение уровня LDLc у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) согласно схеме дозирования, которая включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания, где фаза насыщения предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг RNAi-средства, и где фаза поддержания предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 100 мг RNAi-средства, один раз в квартал, где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3' (SEQ ID NO: 685), а смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3' (SEQ ID NO: 686), где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, и введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к PCSK9 или его антигенсвязывающего фрагмента, за счет чего осуществляется лечение субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется гиперлипидемия. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) согласно схеме дозирования, которая включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания, где фаза насыщения предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг RNAi-средства, и где фаза поддержания предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 100 мг RNAi-средства, один раз в квартал, где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3' (SEQ ID NO: 685), а смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3' (SEQ ID NO: 686), где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, и введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к PCSK9 или его антигенсвязывающего фрагмента, за счет чего осуществляется лечение субъекта, у которого имеется гиперлипидемия.

В одном варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9, представляет собой гиперлипидемию, такую как гиперхолестеринемия.

В одном варианте осуществления гиперлипидемия представляет собой гиперхолестеринемию.

Двухнитевое RNAi-средство можно вводить субъекту подкожно, например, путем подкожной инъекции, или внутримышечно.

В одном варианте осуществления смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3' (SEQ ID NO: 687), а антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa 3' (SEQ ID NO: 688) (AD-60212), где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-OMe) A, G, C или U; Af, Gf, Cf или Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, G, C или U; dT представляет собой 2"-дезокситимидин; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

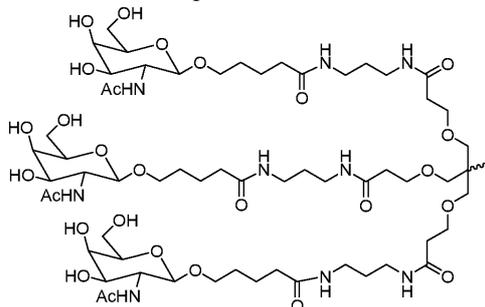
В одном варианте осуществления средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для RNAi дополнительно содержит лиганд.

В одном варианте осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой нити средства на

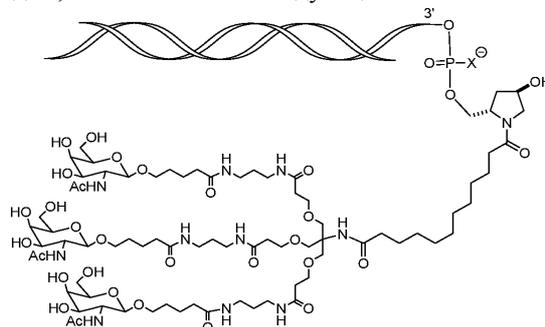
основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для RNAi.

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой



В одном варианте осуществления средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для RNAi конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



и где X представляет собой O или S. В одном варианте осуществления X представляет собой O.

В одном варианте осуществления экспрессия PCSK9 ингибируется по меньшей мере на приблизительно 30%.

В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно предусматривают определение генотипа или фенотипа субъекта по LDLR.

В одном варианте осуществления введение двухнитевого RNAi-средства приводит к снижению уровня холестерина в сыворотке крови у субъекта и/или снижению накопления белка PCSK9.

В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно предусматривают определение уровня холестерина в сыворотке крови у субъекта.

В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно предусматривают введение субъекту дополнительного терапевтического средства, например, статина и/или антитела к PCSK9. В одном варианте осуществления антитело к PCSK9 выбрано из группы, состоящей из алирокумаба (Praluent), эволокумаба (Repatha) и бокоцизумаба.

В одном варианте осуществления RNAi-средство вводят в виде фармацевтической композиции.

RNAi-средство можно вводить в незабуферном растворе, таком как солевой раствор или вода, или вводить с буферным раствором. В одном варианте осуществления буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В другом варианте осуществления буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буфер (PBS).

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы ингибирования экспрессии гена PCSK9 у субъекта. Способы включают введение субъекту однократной фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 800 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3' (SEQ ID NO: 687), а антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-asCfsaAfAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa - 3' (SEQ ID NO: 688) (AD-60212), где a, g, c и u представляют собой 2'-O-метил-модифицированные (2'-OMe) A, G, C или U; Af, Gf, Cf или Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, G, C или U; dT представляет собой 2"-дезокситимидин; и s представляет собой фосфотиоатную связь, и введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к PCSK9 или его антигенсвязывающего фрагмента, вследствие чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена PCSK9 у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы снижения уровня липопротеинов низкой плотности (LDLc) у субъекта. Способы включают введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 800 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмы-

словую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu - 3' (SEQ ID NO: 687), а антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa - 3' (SEQ ID NO: 688) (AD-60212), где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-ОМе) A, G, C или U; Af, Gf, Cf или Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, G, C или U; dT представляет собой 2"-дезокситимидин; и s представляет собой фосфотиоатную связь, и введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к PCSK9 или его антигенсвязывающего фрагмента, вследствие чего обеспечивается снижение уровня LDLc у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9. Способы включают введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 800 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3' (SEQ ID NO: 687), а антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa 3' (SEQ ID NO: 688) (AD-60212), где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-ОМе) A, G, C или U; Af, Gf, Cf или Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, G, C или U; dT представляет собой 2"-дезокситимидин; и s представляет собой фосфотиоатную связь, и введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к PCSK9 или его антигенсвязывающего фрагмента, за счет чего осуществляется лечение субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется гиперлипидемия. Способы включают введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 800 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu - 3' (SEQ ID NO: 687), а антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa - 3' (SEQ ID NO: 688) (AD-60212), где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-ОМе) A, G, C или U; Af, Gf, Cf или Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, G, C или U; dT представляет собой 2"-дезокситимидин; и s представляет собой фосфотиоатную связь, и введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к PCSK9 или его антигенсвязывающего фрагмента, за счет чего осуществляется лечение субъекта, у которого имеется гиперлипидемия.

В одном варианте осуществления субъекту вводят фиксированную дозу, составляющую от приблизительно 200 мг до приблизительно 800 мг, один раз в квартал. В другом варианте осуществления субъекту вводят фиксированную дозу, составляющую от приблизительно 200 мг до приблизительно 800 мг, два раза в год.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы ингибирования экспрессии гена PCSK9 у субъекта. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) согласно схеме дозирования, которая включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания, где фаза насыщения предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг RNAi-средства, и где фаза поддержания предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 800 мг RNAi-средства, один раз в квартал, где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'- csusagacCfuGfudTuugcuuuugu - 3' (SEQ ID NO: 687), а антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'- asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa 3' (SEQ ID NO: 688) (AD-60212), где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-ОМе) A, G, C или U; Af, Gf, Cf или Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, G, C или U; dT представляет собой 2"-дезокситимидин; и s представляет собой фосфотиоатную связь, и введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к PCSK9 или его антигенсвязывающего фрагмента, вследствие чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена PCSK9 у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы снижения уровня липопротеинов низкой плотности (LDLc) у субъекта. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) согласно схеме дозирования, которая включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания, где фаза насыщения предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг RNAi-средства, и где фаза поддержания предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 100 мг RNAi-средства, один раз в квартал, где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'- csusagacCfuGfudTuugcuuuugu -

3' (SEQ ID NO: 687), а антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa 3' (SEQ ID NO: 688) (AD-60212), где a, g, с и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-ОМе) A, G, C или U; Af, Gf, Cf или Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, G, C или U; dT представляет собой 2"-дезокситимидин; и s представляет собой фосфотиоатную связь, и введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к PCSK9 или его антигенсвязывающего фрагмента, вследствие чего обеспечивается снижение уровня LDLc у субъекта.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) согласно схеме дозирования, которая включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания, где фаза насыщения предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг RNAi-средства, и где фаза поддержания предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 100 мг RNAi-средства, один раз в квартал, где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'- csusagacCfuGfudTuugcuuuugu -3' (SEQ ID NO: 687), а антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'- asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa 3' (SEQ ID NO: 688) (AD-60212), где a, g, с и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-ОМе) A, G, C или U; Af, Gf, Cf или Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, G, C или U; dT представляет собой 2"-дезокситимидин; и s представляет собой фосфотиоатную связь, и введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к PCSK9 или его антигенсвязывающего фрагмента, за счет чего осуществляется лечение субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется гиперлипидемия. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) согласно схеме дозирования, которая включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания, где фаза насыщения предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг RNAi-средства, и где фаза поддержания предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 100 мг RNAi-средства, один раз в квартал, где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'- csusagacCfuGfudTuugcuuuugu -3' (SEQ ID NO: 687), а антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAf gGfuCfuagsasa 3' (SEQ ID NO: 688) (AD-60212), где a, g, с и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-ОМе) A, G, C или U; Af, Gf, Cf или Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, G, C или U; dT представляет собой 2"-дезокситимидин; и s представляет собой фосфотиоатную связь, и введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к PCSK9 или его антигенсвязывающего фрагмента, за счет чего осуществляется лечение субъекта, у которого имеется гиперлипидемия.

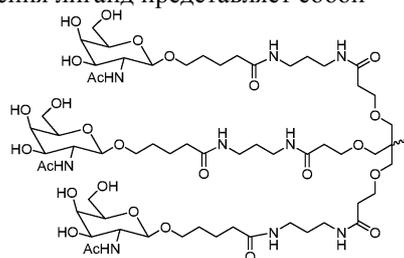
В одном варианте осуществления субъекту вводят поддерживающую дозу в виде фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 800 мг, один раз в квартал. В другом варианте осуществления субъекту вводят поддерживающую дозу в виде фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 800 мг, два раза в год.

В одном варианте осуществления средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для RNAi дополнительно содержит лиганд.

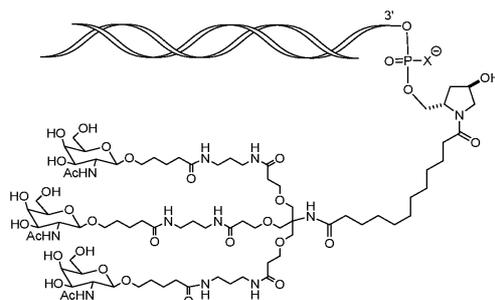
В одном варианте осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой нити средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для RNAi.

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой



В одном варианте осуществления средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для RNAi конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



и где X представляет собой O или S. В одном варианте осуществления X представляет собой O.

В одном варианте осуществления антитело к PCSK9 или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из алирокумаба (Praluent), эволокумаба (Repatha) и бокоцизумаба.

В одном варианте осуществления способы дополнительно включают введение субъекту дополнительного терапевтического средства, например, статина.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены наборы для осуществления способа по настоящему изобретению. Наборы включают RNAi-средство и инструкции по применению, а также необязательно приспособления для введения RNAi-средства субъекту.

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано следующим подробным описанием и графическими материалами.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой график, на котором показано обусловленное нокдауном падение уровней белка PCSK9, показанное как процент среднего обусловленного нокдауном падения PCSK9 относительно уровня в начальный момент времени, у субъектов, получавших однократную фиксированную дозу AD-60212.

Фиг. 2 представляет собой график, на котором показано снижение уровней LDL-с, показанное в виде процента среднего снижения LCL-C относительно уровня в начальный момент времени, у субъектов, получавших однократную фиксированную дозу AD-60212.

Фиг. 3 представляет собой график, на котором показано обусловленное нокдауном падение уровней белка PCSK9, показанное как процент среднего обусловленного нокдауном падения PCSK9 относительно уровня в начальный момент времени, у субъектов, получавших несколько фиксированных доз AD-60212.

Фиг. 4 представляет собой график, на котором показано снижение уровней LDL-C, показанное в виде процента среднего снижения LCL-C относительно уровня в начальный момент времени, у субъектов, получавших несколько фиксированных доз AD-60212.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на неожиданном обнаружении того, что однократная доза двухнитевого RNAi-средства, содержащего химические модификации, демонстрирует исключительную эффективность и продолжительность действия в отношении ингибирования экспрессии PCSK9. Конкретно, однократная фиксированная доза, например фиксированная доза, составляющая от приблизительно 300 мг до приблизительно 500 мг, RNAi-средств, нацеливающихся на ген PCSK9 человека, например, нуклеотиды 3544-3623 гена PCSK9 человека (нуклеотиды 3544-3623 из SEQ ID NO:1), например, нуклеотиды 3601-3623 из SEQ ID NO:1, содержащих лиганд GalNAc, как показано в данном документе, является исключительно эффективной и длительно действующей в отношении подавления активности гена PCSK9.

Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены способы ингибирования экспрессии гена PCSK9 и способы лечения субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие ингибирование или снижение уровня экспрессии гена PCSK9, например, нарушение, опосредованное экспрессией PCSK9, такое как гиперлипидемия, например гиперхолестеринемия, с применением композиций на основе iRNA, которые осуществляют опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена PCSK9.

В следующем подробном описании раскрывается то, как получать и применять композиции, содержащие iRNA, для ингибирования экспрессии гена PCSK9, а также композиции, пути применения и способы лечения субъектов, у которых имеются заболевания и нарушения, на которые будет оказывать благоприятное воздействие ингибирование и/или снижение экспрессии данного гена.

I. Определения.

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

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

означает один элемент или несколько элементов, например, множество элементов.

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

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

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

Термин "по меньшей мере" перед числовым значением или группой числовых значений понимают как включающий числовое значение, находящееся рядом с термином "по меньшей мере", и все последующие числовые значения или целые числа, которые могут быть по логике включены, что ясно из контекста. Например, число нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты должно быть целым числом. Например, "по меньшей мере 18 нуклеотидов молекулы нуклеиновой кислоты из 21 нуклеотида" означает, что указанным свойством обладают 18, 19, 20 или 21 нуклеотидов. Если "по меньшей мере" находится перед группой числовых значений или диапазоном, следует понимать, что "по меньшей мере" может модифицировать каждое из числовых значений в группе или диапазоне.

Как используется в данном документе, под выражением "не более чем" или "менее чем" понимают значение, следующее за данной фразой, и последовательные более низкие значения или целые числа, логически следующие из контекста, до нуля. Например, дуплекс с выступающим концом, состоящим из "не более чем 2 нуклеотидов", имеет выступающий конец из 2, 1 или 0 нуклеотидов. Если выражение "не более чем" находится перед группой числовых значений или диапазоном, понятно, что выражение "не более чем" может модифицировать каждое из числовых значений в группе или диапазоне.

Как используется в данном документе, "PCSK9" относится к гену или белку пропротеинконвертазы субтилизин/кексинового типа 9. PCSK9 также известна как FH3, HCHOLA3, NARC-1 или NARCl. Термин PCSK9 включает PCSK9 человека, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank под номером доступа GI:299523249 (SEQ ID NO:1); PCSK9 мыши, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank под номером доступа GI:163644257; PCSK9 крысы, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank под номером доступа GI:77020249.

Дополнительные примеры последовательностей мРНК PCSK9 легко доступны в общедоступных базах данных, например, в GenBank, UniProt и OMIM.

В одном варианте осуществления субъектом является человек, такой как человек, подвергаемый лечению или оцениваемый в отношении заболевания, нарушения или состояния, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9; человек, подверженный риску возникновения заболевания, нарушения или состояния, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9; человек, у которого имеется заболевание, нарушение или состояние, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9; и/или человек, подвергаемый лечению заболевания, нарушения или состояния, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9, как описано в данном документе.

Используемые в данном документе термины "осуществление лечения" или "лечение" обозначают благоприятный или требуемый результат, в том числе без ограничения смягчение или уменьшение интенсивности одного или нескольких симптомов, ассоциированных с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9, или замедление или устранение прогрессирования такого нарушения, как выявляемое так и невыявляемое. Например, в контексте гиперлипидемии, лечение может включать снижение уровней липидов в сыворотке крови, например, снижение уровня холестерина липопротеинов высокой плотности (LDLc). "Лечение" также может означать увеличение срока жизни по сравнению с ожидаемым сроком жизни в отсутствие лечения.

Как используется в данном документе, "предупреждение" или "осуществление предупреждения" при использовании в отношении заболевания, нарушения или состояния, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена PCSK9, обозначает снижение вероятности того, что у субъекта разовьется симптом, ассоциированный с заболеванием, нарушением или состоянием, опосредованными экспрессией PCSK9, например такой симптом, как сердечно-сосудистое заболевание, например, болезнь коронарных артерий (CAD) (также известная как ишемическая болезнь сердца (CHD)), или транзиторная ишемическая атака (TIA), или инсульт. Вероятность развития такого симптома снижена, например, если у индивидуума, имеющего один или несколько факторов риска (например, диабет, предыдущий случай CHD или некоронарного атеросклероза в анамнезе (например, аневризма брюшной

аорты, заболевание периферических артерий и стеноз сонных артерий), случай сердечно-сосудистого заболевания в семейном анамнезе, например, у родственников по мужской линии моложе 50 лет или у родственников по женской линии моложе 60 лет, потребление табака, гипертония и/или ожирение (BMI ≥ 30) возникновения заболевания, нарушения или состояния, опосредованных экспрессией PCSK9, например, гиперхолестеринемии, не развивается, например, болезнь коронарных артерий, или развивается, например, болезнь коронарных артерий, с меньшей степенью тяжести относительно популяции, имеющей те же факторы риска и не получающей лечение, описанное в данном документе. Отсутствие развития заболевания, нарушения или состояния, или ослабление развития симптома, ассоциированного с таким заболеванием, нарушением или состоянием (например, по меньшей мере на приблизительно 10% по принятой в клинической практике шкале для такого заболевания или нарушения), или отсрочка проявления латентных симптомов (например, на несколько дней, недель, месяцев или лет) считаются эффективным предупреждением. Для предупреждения может потребоваться введение более чем одной дозы.

Подразумевается, что взаимозаменяемо используемые термины "PCSK9-ассоциированное заболевание" и "нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9", как используется в данном документе, включают любое заболевание, нарушение или состояние, ассоциированные с геном или белком PCSK9. Такие заболевания могут быть вызваны, например, избыточной выработкой белка PCSK9, мутациями гена PCSK9, аномальным расщеплением белка PCSK9, аномальными взаимодействиями между PCSK9 и другими белками или другими эндогенными или экзогенными веществами. Иллюстративные PCSK9-ассоциированные заболевания включают формы липидемии, например гиперлипидемию, и другие формы нарушения липидного баланса, такие как гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия, и патологические состояния, ассоциированные с этими нарушениями, например, CHD и атеросклероз.

Используемый в данном документе термин "гиперхолестеринемия" обозначает форму гиперлипидемии (повышенные уровни липидов в крови), при которой у субъекта наблюдаются высокие уровни холестерина в сыворотке крови, например, по меньшей мере приблизительно 240 мг/дл общего холестерина.

Используемый в данном документе термин "сердечно-сосудистое заболевание" обозначает заболевание, поражающее сердце или кровеносные сосуды, которое включает, например, артериосклероз, заболевание коронарных артерий (или сужение артерий), заболевание клапанов сердца, аритмию, сердечную недостаточность, гипертонию, ортостатическую гипотензию, шок, эндокардит, заболевания аорты и ее ветвей, нарушения периферической сосудистой системы, сердечный приступ, кардиомиопатию и врожденный порок сердца.

Подразумевается, что "терапевтически эффективное количество", как используется в данном документе, включает количество RNAi-средства, которого, при введении пациенту для лечения PCSK9-ассоциированного заболевания, достаточно для осуществления лечения заболевания (например, путем ослабления, уменьшения интенсивности или поддержания существующего уровня заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания). "Терапевтически эффективное количество" может варьироваться в зависимости от RNAi-средства, пути введения средства, заболевания и его тяжести, а также анамнеза, возраста, веса, семейного анамнеза, генетических характеристик, стадии патологических процессов, опосредованных экспрессией PCSK9, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, подлежащего лечению.

Подразумевается, что "профилактически эффективное количество", как используется в данном документе, включает количество RNAi-средства, которого, при введении субъекту, у которого еще не возникли или не проявились симптомы PCSK9-ассоциированного заболевания, но который может иметь предрасположенность к заболеванию, достаточно для предупреждения или уменьшения интенсивности заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания. Уменьшение интенсивности заболевания включает замедление течения заболевания или снижение тяжести заболевания, развивающегося позже. "Профилактически эффективное количество" может варьироваться в зависимости от RNAi-средства, пути введения средства, степени риска развития заболевания, а также анамнеза, возраста, веса, семейного анамнеза, генетических характеристик, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, подлежащего лечению.

"Терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" также включают количество RNAi-средства, которое вызывает некоторый требуемый локальный или системный эффект при приемлемом соотношении польза/риск, предусмотренном для любого лечения. RNAi-средства, применяемые в способах согласно настоящему изобретению, можно вводить в количестве, достаточном для получения приемлемого соотношения польза/риск, предусмотренного для такого лечения.

Как используется в данном документе, "целевая последовательность" обозначает непрерывную часть нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образующейся в ходе транскрипции гена PCSK9, в том числе мРНК, которая является продуктом РНК-процессинга первичного продукта транскрипции. В одном варианте осуществления длина целевой части последовательности будет по меньшей мере достаточной, чтобы она служила субстратом для iRNA-направленного расщепления в этой части или рядом с этой частью нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образующейся в ходе тран-

скрипции гена PCSK9.

Длина целевой последовательности может составлять приблизительно 9-36 нуклеотидов, например, приблизительно 15-30 нуклеотидов. Например, длина целевой последовательности может составлять приблизительно 15-30 нуклеотидов 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, или 21-22 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления длина целевой последовательности составляет от приблизительно 19 до приблизительно 30 нуклеотидов. В других вариантах осуществления длина целевой последовательности составляет от приблизительно 19 до приблизительно 25 нуклеотидов. В еще нескольких других вариантах осуществления длина целевой последовательности составляет от приблизительно 19 до приблизительно 23 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина целевой последовательности составляет от приблизительно 21 до приблизительно 23 нуклеотидов. Также предусматривается, что диапазоны и значения длины, промежуточные относительно вышеупомянутых диапазонов и значений длины, являются частью настоящего изобретения.

Используемый в данном документе термин "нить, содержащая последовательность" обозначает олигонуклеотид, содержащий цепь из нуклеотидов, которая описывается последовательностью, обозначаемой с использованием стандартной номенклатуры нуклеотидов.

Каждый из "G", "C", "A", "T" и "U", как правило, обозначает нуклеотид, который в качестве основания содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил соответственно. Однако будет понятно, что термин "рибонуклеотид" или "нуклеотид" также может обозначать модифицированный нуклеотид, как более подробно описано ниже, или суррогатный заменяющий фрагмент (см., например, таблицу В). Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть заменены другими фрагментами практически без изменения свойств образования пар оснований у олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такой заменяющий фрагмент. Например, без ограничения, нуклеотид, содержащий в качестве основания инозин, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть заменены в нуклеотидных последовательностях dsRNA, представленных в настоящем изобретении, нуклеотидами, содержащими, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любом месте олигонуклеотида могут быть заменены на гуанин и урацил соответственно для образования неоднозначных пар оснований G-U с целевой мРНК. Последовательности, содержащие такие заменяющие фрагменты, подходят для композиций и способов, представленных в настоящем изобретении.

Термины "iRNA", "RNAi-средство", "средство на основе iRNA", "средство для РНК-интерференции", используемые в данном документе взаимозаменяемо, обозначают средство, которое содержит РНК, в том значении, в котором этот термин определен в данном документе, и которое опосредует нацеленное расщепление РНК-транскрипта посредством пути с участием РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC). iRNA управляет специфическим в отношении последовательности разрушением мРНК посредством процесса, который известен как РНК-интерференция (RNAi). iRNA модулирует, например ингибирует, экспрессию PCSK9 в клетке, например, в клетке в организме субъекта, такого как субъект-млекопитающее.

В одном варианте осуществления RNAi-средство по настоящему изобретению включает одонитевую РНК, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, целевой последовательностью мРНК PCSK9, управляя расщеплением целевой РНК. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, предполагают, что длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, расщепляется на siRNA под действием эндонуклеазы III типа, известной под названием Dicer (Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485). Dicer, фермент, подобный рибонуклеазе III типа, обеспечивает процессинг dsRNA до коротких интерферирующих РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными 3'-выступающими концами из двух оснований (Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363). Затем siRNA встраиваются в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, что позволяет комплементарной антисмысловой нити управлять распознаванием мишени (Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень с индукцией сайленсинга (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188). Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к одонитевой РНК (siRNA), образуемой внутри клетки, которая способствует образованию RISC-комплекса для осуществления сайленсинга целевого гена, т. е. гена PCSK9. Соответственно, термин "siRNA" также используют в данном документе для обозначения RNAi, описанной выше.

В другом варианте осуществления RNAi-средство может представлять собой одонитевую siRNA, которую вводят в клетку или организм для ингибирования целевой мРНК. Одонитевые RNAi-средства связываются с эндонуклеазой RISC, Argonaute 2, которая затем расщепляет целевую мРНК. Одонитевые siRNA, как правило, содержат 15-30 нуклеотидов и являются химически модифицированными. Конструирование и тестирование одонитевых siRNA описаны в патенте США № 8101348 и в Lima et al., (2012) Cell 150: 883-894, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный доку-

мент посредством ссылки. Любые антисмысловые нуклеотидные последовательности, описанные в данном документе, можно применять в качестве односторонней siRNA, как описано в данном документе, или в качестве химически модифицированной с помощью способов, описанных в Lima et al., (2012) Cell 150:883-894.

В другом варианте осуществления "iRNA" для применения в композициях, путях применения и способах по настоящему изобретению представляет собой двухнитевую РНК, и в данном документе она обозначается как "двухнитевое RNAi-средство", "молекула двухнитевой РНК (dsRNA)", "средство на основе dsRNA" или "dsRNA". Термин "dsRNA" обозначает комплекс молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющий дуплексную структуру, который содержит две антипараллельные и практически комплементарные нити нуклеиновой кислоты, обозначаемые как имеющие "смысловую" и "антисмысловую" ориентацию с точки зрения целевой РНК, т. е. гена PCSK9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения двухнитевая РНК (dsRNA) запускает разрушение целевой РНК, например, мРНК, через пост-транскрипционный механизм сайленсинга генов, обозначаемый в данном документе как РНК-интерференция или RNAi.

Как правило, большинство нуклеотидов каждой нити молекулы dsRNA являются рибонуклеотидами, но, как подробно описано в данном документе, каждая нить или обе нити могут также содержать один или несколько нуклеотидов, не являющихся рибонуклеотидами, например, дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, используемый в настоящем описании термин "RNAi-средство" может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; при этом RNAi-средство может включать значительные модификации нескольких нуклеотидов. Такие модификации могут включать все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных из уровня техники. Любые такие модификации, как используемые в молекуле типа siRNA, охватываются термином "RNAi-средство" для целей настоящего описания и формулы изобретения.

Дуплексный участок может быть любой длины, которая позволяет осуществлять специфическое разрушение требуемой целевой РНК посредством пути с участием RISC, при этом его длина может находиться в диапазоне от приблизительно 9 до 36 пар оснований, например, его длина может составлять приблизительно 15-30 пар оснований, например, приблизительно 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 пар оснований, как, например, приблизительно 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, или 21-22 пары оснований. Также предусматривается, что диапазоны и значения длины, промежуточные относительно вышеупомянутых диапазонов и значений длины, являются частью настоящего изобретения.

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

Если две практически комплементарные нити dsRNA образованы отдельными молекулами РНК, то эти молекулы не должны, но могут быть соединены ковалентно. Если две нити соединены ковалентно иным образом, нежели непрерывающейся цепью нуклеотидов от 3'-конца одной нити до 5'-конца соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, то соединительная структура обозначается как "линкер". Нити РНК могут иметь одинаковое или разное число нуклеотидов. Максимальное число пар оснований представляет собой число нуклеотидов в самой короткой нити dsRNA за вычетом любых выступающих концов, которые присутствуют в дуплексе. Помимо дуплексной структуры RNAi-средство может содержать один или несколько нуклеотидных выступающих концов. В одном варианте осуществления RNAi-средства по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например, из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В других вариантах осуществления по меньшей мере одна нить RNAi-средства содержит 5'-выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна нить содержит 5'-выступающий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов,

например, из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В еще нескольких других вариантах осуществления как 3'-, так и 5'-конец одной нити RNAi-средства содержит выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида.

В одном варианте осуществления RNAi-средство по настоящему изобретению представляет собой средство на основе dsRNA, каждая нить которой содержит 19-23 нуклеотида, взаимодействующее с целевой последовательностью РНК, т.е. целевой последовательностью мРНК PCSK9. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, расщепляется на siRNA под действием эндонуклеазы III типа, известной под названием Dicer (Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485). Dicer, фермент, подобный рибонуклеазе III типа, обеспечивает процессинг dsRNA до коротких интерферирующих РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными 3'-выступающими концами из двух оснований (Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363). Затем siRNA встраиваются в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, что позволяет комплементарной антисмысловой нити управлять распознаванием мишени (Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень с индукцией сайленсинга (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188).

В другом варианте осуществления RNAi-средство по настоящему изобретению представляет собой dsRNA из 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, целевой последовательностью мРНК PCSK9, управляя расщеплением целевой РНК. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, расщепляется на siRNA под действием эндонуклеазы III типа, известной под названием Dicer (Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485). Dicer, фермент, подобный рибонуклеазе III типа, обеспечивает процессинг dsRNA до коротких интерферирующих РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными 3'-выступающими концами из двух оснований (Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363). Затем siRNA встраиваются в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, что позволяет комплементарной антисмысловой нити управлять распознаванием мишени (Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень с индукцией сайленсинга (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188).

Используемый в данном документе термин "нуклеотидный выступающий конец" обозначает по меньшей мере один неспаренный нуклеотид, который выступает из дуплексной структуры iRNA, например dsRNA. Например, если 3'-конец одной нити dsRNA выходит за пределы 5'-конца другой нити или наоборот, то образуется нуклеотидный выступающий конец. dsRNA может содержать выступающий конец по меньшей мере из одного нуклеотида; в качестве альтернативы выступающий конец может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или больше. Нуклеотидный выступающий конец может содержать аналог нуклеотида/нуклеозида, в том числе дезоксинуклеотид/нуклеозид, или состоять из него. Выступающий конец(ы) может находиться на смысловой нити, антисмысловой нити или любой их комбинации. Более того, нуклеотид(ы) выступающего конца может присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах антисмысловой или смысловой нити dsRNA.

В одном варианте осуществления dsRNA по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например, из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В других вариантах осуществления по меньшей мере одна нить RNAi-средства содержит 5'-выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна нить содержит 5'-выступающий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например, из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В еще нескольких других вариантах осуществления как 3'-, так и 5'-конец одной нити RNAi-средства содержит выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида.

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

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

определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует на 5'-конце антисмысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления один или несколько нуклеотидов в выступающем конце заменены на нуклеозидтрифосфат. В определенных вариантах осуществления выступающий конец содержит самокомплементарную часть, так что выступающий конец способен образовывать шпильчатую структуру, которая является стабильной в физиологических условиях.

"Затупленный конец" или "тупой конец" означают, что на конце двухнитевого RNAi-средства отсутствуют неспаренные нуклеотиды, т. е. отсутствует нуклеотидный выступающий конец. RNAi-средство с "тупыми концами" представляет собой dsRNA, которая является двухнитевой по всей своей длине, т.е. не имеет нуклеотидного выступающего конца ни на одном конце молекулы. RNAi-средства по настоящему изобретению включают RNAi-средства с нуклеотидными выступающими концами на одном конце (т. е. средства с одним выступающим концом и одним тупым концом) или с нуклеотидными выступающими концами на обоих концах.

Термин "антисмысловая нить" или "направляющая нить" обозначает нить iRNA, например dsRNA, которая содержит участок, практически комплементарный целевой последовательности, например мРНК PCSK9. Используемый в данном документе термин "участок комплементарности" обозначает участок в антисмысловой нити, который практически комплементарен последовательности, например, целевой последовательности, например, нуклеотидной последовательности PCSK9, как определено в данном документе. Если участок комплементарности не полностью комплементарен целевой последовательности, во внутренних или концевых участках молекулы могут находиться ошибки спаривания. Как правило, наиболее допустимые ошибки спаривания находятся в концевых участках, например, в пределах 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида от 5'- и/или 3'-конца iRNA. В одном варианте осуществления двухнитевое RNAi-средство по настоящему изобретению включает ошибку спаривания нуклеотидов в антисмысловой нити. В другом варианте осуществления двухнитевое RNAi-средство по настоящему изобретению включает ошибку спаривания нуклеотидов в смысловой нити. В одном варианте осуществления ошибка спаривания нуклеотидов находится, например, в пределах 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида от 3'-конца iRNA. В другом варианте осуществления ошибка спаривания нуклеотидов находится, например, в 3'-концевом нуклеотиде iRNA.

Термин "смысловая нить" или "сопровождающая нить", используемый в данном документе, обозначает нить iRNA, которая содержит участок, практически комплементарный участку антисмысловой нити, в том значении, в котором этот термин определен в данном документе.

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

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

Комплементарные последовательности в пределах iRNA, например, в пределах dsRNA, как описано в данном документе, предусматривают образование пар оснований между олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащими первую полинуклеотидную последовательность, и олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащими вторую нуклеотидную последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. В данном документе такие последовательности могут обозначаться как "полностью комплементарные" по отношению друг к другу. Тем не менее, если в данном документе первую последовательность обозначают как "практически комплементарную" по отношению ко второй последовательности, то две последовательности могут быть полностью комплементарными или в них может происходить ошибочное спаривание одной или нескольких, но, как правило, не более 5, 4, 3 или 2 пар оснований при гибридизации с образованием дуплекса размером до 30 пар оснований, при этом сохраняется способность к гибридизации в условиях, наиболее соответствующих их конечному

применению, например, ингибированию экспрессии гена посредством пути с участием RISC. Однако, если два олигонуклеотида разработаны так, чтобы после гибридизации образовывался один или несколько одонитевых выступающих концов, то такие выступающие концы не будут считаться ошибками спаривания применительно к определению комплементарности. Например, dsRNA, содержащая один олигонуклеотид длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид длиной 23 нуклеотида, где более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, может при этом обозначаться как "полностью комплементарная" для целей, описанных в данном документе.

"Комплементарные" последовательности, используемые в данном документе, могут также содержать пары оснований или могут быть полностью образованы из таких пар, которые образованы не по модели Уотсона-Крика, и/или пар оснований, образованных из неприродных и модифицированных нуклеотидов, в той мере, в которой выполняются вышеуказанные требования по отношению к их способности к гибридизации. Такие пары оснований, образованные не по модели Уотсона-Крика, включают без ограничения неоднозначные G:U или Хугстиновские пары оснований.

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

Как используется в данном документе, полинуклеотид, который "практически комплементарен по меньшей мере части" матричной РНК (мРНК), обозначает полинуклеотид, который практически комплементарен непрерывной части мРНК, представляющей интерес (например, мРНК, кодирующей PCSK9). Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части мРНК PCSK9, если последовательность является практически комплементарной непрерывающейся части мРНК, кодирующей PCSK9.

В целом большинство нуклеотидов каждой нити представляют собой рибонуклеотиды, но, как подробно описано в данном документе, каждая нить или обе нити могут также включать один или несколько нуклеотидов, не являющихся рибонуклеотидами, например, дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, "iRNA" может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями. Такие модификации могут включать все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных из уровня техники. Любые такие модификации, которые используются в молекуле iRNA, охватываются термином "iRNA" в контексте данных описания и формулы изобретения.

В одном аспекте настоящего изобретения средство для применения в способах и композициях по настоящему изобретению представляет собой молекулу одонитевой антисмысловой РНК, которая ингибирует целевую мРНК посредством механизма антисмыслового ингибирования. Молекула одонитевой антисмысловой РНК комплементарна последовательности в пределах целевой мРНК. Одонитевые антисмысловые олигонуклеотиды могут ингибировать трансляцию стехиометрическим образом путем спаривания оснований с мРНК и физического воспрепятствования механизму трансляции, см. Dias, N. et al., (2002) *Mol Cancer Ther* 1:347-355. Длина молекулы одонитевой антисмысловой РНК может составлять от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов, и она имеет последовательность, комплементарную целевой последовательности. Например, молекула одонитевой антисмысловой РНК может содержать последовательность, которая содержит по меньшей мере приблизительно 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше смежных нуклеотидов из любой из антисмысловых последовательностей, описанных в данном документе.

II. Способы по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении предусмотрены способы ингибирования экспрессии гена пропротеин-конвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9) у субъекта. В настоящем изобретении также предусмотрены терапевтические и профилактические способы лечения или предупреждения заболеваний и состояний, которые можно модулировать путем подавления экспрессии гена PCSK9. Например, композиции, описанные в данном документе, можно применять для лечения липидемии, например гиперлипидемии, и других форм нарушения липидного баланса, таких как гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия, и патологических состояний, ассоциированных с этими нарушениями, таких как болезни сердца и системы кровообращения. Другие заболевания и состояния, которые можно модулировать путем подавления экспрессии гена PCSK9, включают лизосомные болезни накопления, в том числе без ограничения болезнь Ниманна-Пика, болезнь Тея-Сакса, дефицит лизосомной кислой липазы и болезнь Гоше. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества или профилактически эффективного количества RNAi-средства по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение эффективного количества средства на основе iRNA к PCSK9 пациенту с гетерозиготным по LDLR генотипом.

Поскольку PCSK9 регулирует уровни рецептора LDL, который, в свою очередь, удаляет частицы LDL с высоким содержанием холестерина из плазмы крови, то эффект сниженной экспрессии гена PCSK9 предпочтительно приводит к снижению уровней LDLc (холестерина липопротеинов высокой плотности) в крови, и более конкретно в сыворотке крови млекопитающего. В некоторых вариантах

осуществления уровни LDLc снижаются по меньшей мере на 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более по сравнению с уровнями перед лечением. Соответственно, в настоящем изобретении также предусмотрены способы снижения уровня холестерина низкой плотности (LDLc) в сыворотке крови субъекта.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения двухнитевое RNAi-средство вводят субъекту в виде фиксированной дозы. "Фиксированная доза" (например, доза в мг) означает, что для всех субъектов применяют одну дозу средства на основе iRNA независимо от любых специфических связанных с субъектом факторов, таких как вес. В других вариантах осуществления средство на основе iRNA по настоящему изобретению вводят субъекту в виде дозы по весу. "Доза по весу" (например, доза в мг/кг) представляет собой дозу средства на основе iRNA, которая будет изменяться в зависимости от веса субъекта.

В определенных вариантах осуществления RNAi-средство вводят субъекту в виде фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 100 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 250 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 350 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 450 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 500 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 550 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 600 до приблизительно 700 мг, от приблизительно 650 до приблизительно 700 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 250 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 350 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 450 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 500 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 550 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 600 до приблизительно 650 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 250 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 350 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 450 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 500 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 550 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 250 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 350 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 450 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 500 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 250 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 350 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 500 мг или от приблизительно 450 мг до приблизительно 500 мг, например, фиксированной дозы, составляющей приблизительно 100 мг, приблизительно 125 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 175 мг, 200 мг, приблизительно 225 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 275 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 325 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 375 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 425 мг, приблизительно 450 мг, приблизительно 475 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 525 мг, приблизительно 550 мг, приблизительно 575 мг, приблизительно 600 мг, приблизительно 625 мг, приблизительно 650 мг, приблизительно 675 мг или приблизительно 700 мг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к вышеизложенным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Введение можно повторять, например, на регулярной основе. Например, фиксированную дозу можно вводить субъекту с интервалом один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц, один раз в квартал или два раза в год в течение шести месяцев, или года, или дольше, т.е. в виде постоянного приема.

В одном варианте осуществления субъекту вводят фиксированную дозу, составляющую от приблизительно 25 мг до приблизительно 50 мг, один раз в неделю. В другом варианте осуществления субъекту вводят фиксированную дозу, составляющую от приблизительно 50 мг до приблизительно 100 мг, один раз в две недели. В другом варианте осуществления субъекту вводят фиксированную дозу, составляющую от приблизительно 100 мг до приблизительно 200 мг, один раз в месяц. В еще одном варианте осуществления субъекту вводят фиксированную дозу, составляющую от приблизительно 300 мг до приблизительно 600 мг, один раз в квартал. В другом варианте осуществления субъекту вводят фиксированную дозу, составляющую от приблизительно 300 мг до приблизительно 600 мг, два раза в год (т.е. дважды в год).

Соответственно, в одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы ингибирования экспрессии гена PCSK9 у субъекта. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), например dsRNA, по настоящему изобретению (например, фар-

мацевтической композиции, содержащей dsRNA по настоящему изобретению), где в общей сложности от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг двухнитевого RNAi-средства вводят субъекту раз в квартал или два раза в год, и где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 3544-3623 из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы снижения уровня липопротеинов низкой плотности (LDLc) у субъекта. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), где в общей сложности от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг двухнитевого RNAi-средства вводят субъекту раз в квартал или два раза в год, и где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 3544-3623 из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1, вследствие чего обеспечивается снижение уровня LDLc у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9, такое как гиперлипидемия, например гиперхолестеринемия. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), например dsRNA, по настоящему изобретению (например, фармацевтической композиции, содержащей dsRNA по настоящему изобретению), где в общей сложности от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг двухнитевого RNAi-средства вводят субъекту раз в квартал или два раза в год, и где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 3544-3623 из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется гиперлипидемия, такая как гиперхолестеринемия. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), например dsRNA, по настоящему изобретению (например, фармацевтической композиции, содержащей dsRNA по настоящему изобретению), где в общей сложности от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг двухнитевого RNAi-средства вводят субъекту раз в квартал или два раза в год, и где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 3544-3623 из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1.

Как указано выше, введение субъекту RNAi-средств можно повторять на регулярной основе, например, с интервалом один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц, один раз в квартал или два раза в год.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления RNAi-средство вводят согласно схеме дозирования, которая включает "фазу насыщения" из введений с небольшими интервалами, за которой может следовать "фаза поддержания", при которой RNAi-средство вводят с более длительными интервалами. Например, после введения один раз в неделю или два раза в неделю в течение одного месяца введение можно повторять один раз в месяц в течение шести месяцев, или года, или дольше, т.е. в виде постоянного приема.

В одном варианте осуществления фаза насыщения предусматривает однократное введение RNAi-средства в течение первой недели. В другом варианте осуществления фаза насыщения предусматривает однократное введение RNAi-средства в течение первых двух недель. В еще одном варианте осуществления фаза насыщения предусматривает однократное введение RNAi-средства в течение первого месяца.

В определенных вариантах осуществления RNAi-средство вводят субъекту в течение фазы насыщения в виде фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 100 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 250 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 350 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 450 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 500 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 550 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 600 до приблизительно 700 мг, от приблизительно 650 до приблизительно 700 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 250 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 350 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 450 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 500 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 550 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 600 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 650 мг до приблизительно 650 мг.

600 до приблизительно 650 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 250 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 350 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 450 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 500 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 550 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 250 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 350 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 450 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 500 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 250 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 350 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 500 мг или от приблизительно 450 мг до приблизительно 500 мг, например, фиксированной дозы, составляющей приблизительно 100 мг, приблизительно 125 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 175 мг, 200 мг, приблизительно 225 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 275 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 325 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 375 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 425 мг, приблизительно 450 мг, приблизительно 475 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 525 мг, приблизительно 550 мг, приблизительно 575 мг, приблизительно 600 мг, приблизительно 625 мг, приблизительно 650 мг, приблизительно 675 мг или приблизительно 700 мг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к вышеизложенным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления фаза поддержания предусматривает введение субъекту дозы RNAi-средства один раз в месяц, один раз в два месяца, один раз в три месяца, один раз в четыре месяца, один раз в пять месяцев или один раз в шесть месяцев. В одном конкретном варианте осуществления поддерживающую дозу вводят субъекту один раз в месяц.

Поддерживающая доза или дозы могут быть такими же или более низкими, чем начальная доза, например, составлять половину начальной дозы. Например, поддерживающая доза, которую вводят субъекту ежемесячно, может составлять от приблизительно 25 мг до приблизительно 100 мг, например, от приблизительно 25 мг до приблизительно 75 мг, от приблизительно 25 мг до приблизительно 50 мг или от приблизительно 50 мг до приблизительно 75 мг, например, приблизительно 25 мг, приблизительно 30 мг, приблизительно 35 мг, приблизительно 40 мг, приблизительно 45 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 55 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 65 мг, приблизительно 70 мг, приблизительно 75 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 85 мг, приблизительно 90 мг, приблизительно 95 мг или приблизительно 100 мг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к вышеизложенным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Любую из этих схем необязательно можно повторять с обеспечением одного или нескольких повторов. Число повторов может зависеть от достижения требуемого эффекта, например супрессии гена PCSK9, и/или достижения терапевтического или профилактического эффекта, например снижения уровня холестерина в сыворотке крови или ослабления симптома гиперхолестеринемии. После прохождения лечения пациента можно контролировать на предмет изменений в его/ее состоянии. Дозировку RNAi-средства можно либо увеличить в случае, если пациент не реагирует в достаточной степени на текущие уровни дозировки, либо дозу можно снизить, если наблюдается ослабление симптомов болезненного состояния, если болезненное состояние исчезло, или если наблюдаются нежелательные побочные эффекты.

Соответственно, в одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы ингибирования экспрессии гена PCSK9 у субъекта. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) согласно схеме дозирования, которая включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания, где фаза насыщения предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг RNAi-средства, и где фаза поддержания предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 100 мг RNAi-средства, приблизительно один раз в месяц, где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 3544-3623 из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1, вследствие чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена PCSK9 у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы снижения уровня липопротеинов низкой плотности (LDLc) у субъекта. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) согласно схеме дозирования, которая включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания, где фаза насыщения предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг RNAi-

средства, и где фаза поддержания предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 100 мг RNAi-средства, один раз в месяц, где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 3544-3623 из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1, вследствие чего обеспечивается снижение уровня LDLc у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) согласно схеме дозирования, которая включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания, где фаза насыщения предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг RNAi-средства, и где фаза поддержания предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 100 мг RNAi-средства, один раз в месяц, где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 3544-3623 из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1, за счет чего осуществляется лечение субъекта, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется гиперлипидемия. Способы включают введение субъекту средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) согласно схеме дозирования, которая включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания, где фаза насыщения предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг RNAi-средства, и где фаза поддержания предусматривает введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 25 мг до приблизительно 100 мг RNAi-средства, один раз в месяц, где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 3544-3623 из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1, за счет чего осуществляется лечение субъекта, у которого имеется гиперлипидемия.

В одном варианте осуществления средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) для применения в способах по настоящему изобретению содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-ACAAGCAAAACAGGUCUAGAA - 3' (SEQ ID NO: 685), а смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3' (SEQ ID NO: 686), где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

Используемый в данном документе "субъект" включает человека или отличное от человека животное, предпочтительно позвоночное и более предпочтительно млекопитающее. Субъект может включать трансгенный организм. Наиболее предпочтительно, субъектом является человек, такой как человек, страдающий от PCSK9-ассоциированного заболевания или предрасположенный к его развитию.

Способы и пути применения настоящего изобретения включают введение композиции, описанной в данном документе, в результате чего экспрессия целевого гена PCSK9 снижается на длительный период времени, как, например, на приблизительно 80 дней, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, или приблизительно 180 дней или дольше.

Снижение экспрессии гена можно оценить с помощью любых способов, известных из уровня техники. Например, снижение экспрессии PCSK9 можно определить путем определения уровня экспрессии мРНК PCSK9 с применением способов, обычных для среднего специалиста в данной области, например, нозерн-блоттинга, qRT-PCR; путем определения уровня белка PCSK9 с применением способов, обычных для среднего специалиста в данной области, таких как вестерн-блоттинг, иммунологические методики, и/или путем определения биологической активности PCSK9, как, например, эффекта в отношении одного или нескольких показателей липидов в сыворотке крови, таких как, например, уровни общего холестерина, уровни холестерина липопротеинов высокой плотности (HDL), уровни холестерина, отличного от HDL, уровни холестерина липопротеинов очень низкой плотности (VLDL), уровни триглицеридов, уровни Lp(a) и размер частиц липопротеинов.

Введение dsRNA в соответствии со способами и путями применения по настоящему изобретению

может приводить к снижению тяжести, ослаблению выраженности признаков, симптомов и/или маркеров таких заболеваний или нарушений у пациента с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9. Под "снижением" в данном контексте подразумевается статистически значимое снижение такого уровня. Снижение, например, может составлять по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или приблизительно 100%.

Эффективность лечения или предупреждения заболевания можно оценивать, например, путем измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптомов, уровней липидов в сыворотке крови (например, уровней LDLc), оценки качества жизни, дозы лекарственного препарата, требуемой для поддержания эффекта лечения, уровня маркера заболевания или любого другого измеряемого параметра, соответствующего указанному заболеванию, лечение которого осуществляется или предупреждение которого предусматривается. Контроль эффективности лечения или предупреждения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров находится в компетенции специалиста в данной области. Например, эффективность лечения гиперлипидемии можно оценивать, например, с помощью периодического контроля уровней LDLc. Путем сравнения более поздних данных с исходными данными врач получает указание того, является ли лечение эффективным. Контроль эффективности лечения или предупреждения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров находится в компетенции специалиста в данной области.

Лечебный или превентивный эффект является очевидным, когда наблюдается статистически значимое улучшение одного или нескольких параметров патологического состояния, или когда отсутствует ухудшение или развитие симптомов в тех случаях, когда они, наоборот, прогнозировались. В качестве примера показателем эффективного лечения может служить благоприятное изменение измеряемого параметра заболевания по меньшей мере на 10% и предпочтительно по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50% или больше. Об эффективности данного лекарственного средства на основе iRNA или состава с таким лекарственным средством можно также судить с применением экспериментальной животной модели данного заболевания, которая известна из уровня техники. При использовании экспериментальной животной модели эффективность лечения доказана в том случае, когда наблюдают статистически значимое снижение маркера или ослабление симптома.

В качестве альтернативы эффективность можно измерять по снижению тяжести заболевания, как определено специалистом в области диагностики, исходя из принятой в клинической практике шкалы оценки тяжести заболевания. Любое положительное изменение, приводящее, например, к уменьшению тяжести заболевания, как измерено с применением соответствующей шкалы, свидетельствует об адекватном лечении с применением iRNA или состава на основе iRNA, как описано в данном документе.

Как правило, средство на основе iRNA не активизирует иммунную систему, например оно не повышает уровни цитокинов, как, например, уровни TNF-альфа или IFN-альфа. Например, при измерении с помощью анализа, такого как анализ РВМС *in vitro*, как, например, описано в данном документе, повышение уровней TNF-альфа или IFN-альфа составляет менее 30, 20 или 10% от уровня в контрольных клетках, обработанных контрольной dsRNA, такой как dsRNA, которая не нацеливается на PCSK9.

В другом варианте осуществления введение может предусматриваться, когда уровни холестерина липопротеинов низкой плотности (LDLc) достигают или превосходят предопределенный минимальный уровень, как, например, составляют более 70, 130, 150, 200, 300 или 400 мг/дл.

Эффект снижения экспрессии гена PCSK9 предпочтительно приводит к снижению уровней LDLc (холестерина липопротеинов низкой плотности) в крови и, более конкретно, в сыворотке крови млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления уровни LDLc снижаются по меньшей мере на 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более по сравнению с уровнями перед лечением.

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению экспрессия PCSK9 снижается на длительный период времени, например, по меньшей мере на одну неделю, две недели, три недели или четыре недели, или дольше. Например, в некоторых случаях экспрессия гена PCSK9 подавляется по меньшей мере на приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% при введении средства на основе iRNA, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления ген PCSK9 подавляется по меньшей мере на приблизительно 60, 70 или 80% при введении средства на основе iRNA. В некоторых вариантах осуществления ген PCSK9 подавляется по меньшей мере на приблизительно 85, 90 или 95% при введении двухнитевого олигонуклеотида.

RNAi-средства по настоящему изобретению можно вводить субъекту с помощью любого способа введения, известного из уровня техники, в том числе без ограничения подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутриглазного, внутрибронхиального, внутриплеврального, внутрибрюшинного, внутриартериального, лимфатического, спинномозгового и любых их комбинаций. В предпочтительных вариантах осуществления средства вводят подкожно.

В некоторых вариантах осуществления введения осуществляют посредством инъекции депо-препарата. При инъекции депо-препарата RNAi-средство может высвобождаться устойчивым образом в течение длительного периода времени. Таким образом, с помощью инъекции депо-препарата можно снизить частоту введения доз, необходимых для получения требуемого эффекта, например, требуемого ин-

гибирования PCSK9, или терапевтического или профилактического эффекта. Инъекция депо-препарата может также обеспечивать более устойчивые концентрации в сыворотке крови. Инъекции депо-препарата могут включать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции. В предпочтительных вариантах осуществления инъекция депо-препарата представляет собой подкожную инъекцию.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством насоса. Насос может представлять собой внешний насос или насос, имплантируемый хирургическим путем. В определенных вариантах осуществления насос представляет собой подкожно имплантированный осмотический насос. В других вариантах осуществления насос представляет собой инфузионный насос. Инфузионный насос можно применять для внутривенных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. В предпочтительных вариантах осуществления инфузионный насос представляет собой насос для подкожных инфузий. В других вариантах осуществления насос представляет собой имплантированный хирургическим путем насос, который доставляет RNAi-средство в печень.

Другие способы введения включают эпидуральное, внутримозговое, интрацеребровентрикулярное, назальное введение, внутриартериальное, внутрисердечное, внутрикостную инфузию, подоболочечное, и интравитреальное, и легочное. Способ введения можно выбрать, исходя из того, требуется ли местное или системное лечение, и исходя из области, подлежащей лечению. Путь и место введения можно выбирать для усиления нацеливания.

iRNA может быть введена путем внутривенной инфузий в течение некоторого периода времени, например, в течение 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или примерно 25-минутного периода. Введение можно повторять, например, на регулярной основе, как например, один раз в неделю, один раз в две недели (т. е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше. По завершению начальной схемы лечения средства лечения можно вводить на менее частой основе. Например, после введения один раз в неделю или один раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц в течение шести месяцев или года или дольше.

При введении iRNA уровни PCSK9, например, в клетке, ткани, крови, моче или другом компартменте пациента, могут снижаться по меньшей мере на приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65%, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98%, или по меньшей мере на приблизительно 99% или больше.

Перед введением полной дозы iRNA пациентам можно вводить меньшую дозу, такую как 5% от инфузионной дозы, и контролировать в отношении побочных действий, таких как аллергическая реакция. В другом примере пациента можно контролировать в отношении нежелательных иммуностимулирующих эффектов, такие как повышенные уровни цитокинов (например, TNF-альфа или INF-альфа).

За счет ингибиторных эффектов в отношении экспрессии PCSK9 композиция в соответствии с настоящим изобретением или фармацевтическая композиция, полученная из нее, могут повышать качество жизни.

iRNA по настоящему изобретению можно вводить в "голой" форме или в виде "свободной iRNA". "Голую" iRNA вводят в отсутствие фармацевтической композиции. "Голая" iRNA может находиться в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может содержать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В одном варианте осуществления буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буфер (PBS). Значение pH и осмолярность буферного раствора, содержащего iRNA, можно регулировать, чтобы он подходил для введения субъекту.

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

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены способы и пути применения для применения iRNA или фармацевтической композиции на ее основе, например, для лечения субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии PCSK9, например, субъекта, у которого имеется гиперлипидемия, например гиперхолестеринемия, в комбинации с другими фармацевтическими препаратами и/или другими способами терапии, например, с известными фармацевтическими препаратами и/или известными способами терапии, такими как, например, используемые в настоящее время для лечения этих нарушений. siRNA и дополнительное терапевтическое средство можно вводить в комбинации в одной и той же композиции, например, парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельной композиции или другим способом, описанным в данном документе.

Примеры дополнительных терапевтических средств включают средства, при помощи которых, как известно, лечат расстройства липидного обмена, такие как гиперхолестеринемия, атеросклероз или дислипидемия. Например, siRNA, представленные в настоящем изобретении, можно вводить, например, с ингибитором редуктазы HMG-CoA (например, статином), фибратом, секвестрантом желчных кислот, ниацином, антитромбоцитарным средством, ингибитором ангиотензинпревращающего фермента, антагонистом рецепторов ангиотензина II (например, лозартаном калия, как, например Cozaar® от Merck &

Со.)/ ингибитором ацилСоА:холестерин-ацилтрансферазы (АСАТ), ингибитором абсорбции холестерина, ингибитором транспортного белка сложных эфиров холестерина (СЕТР), ингибитором микросомального белка-переносчика триглицеридов (МТТР), модулятором холестерина, модулятором желчных кислот, агонистом рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR), средством для генной терапии, комплексным защитным веществом для сосудов (например, AGI-1067 от Atherogenics), ингибитором гликопротеина IIb/IIIa, аспирином или аспириноподобным веществом, ингибитором ИВАТ (например, S-8921 от Shionogi), ингибитором скваленсинтазы или ингибитором моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP)-I. Иллюстративные ингибиторы редуктазы HMG-CoA включают аторвастатин (Lipitor®/Tahor/Sortis/Torvast/Cardyl от Pfizer), правастатин (Pravachol от Bristol-Myers Squibb, Mevalotin/Sanaprav от Sankyo), симвастатин (Zocor®/Sinvacor от Merck, Denan от Boehringer Ingelheim, Lipovas от Banyu), ловастатин (Mevacor/Mevinacor от Merck, Lovastatina от Bexal, Liposcler от Cepa Schwarz Pharma), флувастатин (Lescol®/Locol/Lochol от Novartis, Cranoc от Fujisawa, Digaril от Solvay), церивастатин (Lipobay от Bayer/Baycol от GlaxoSmithKline), розувастатин (Crestor® от AstraZeneca) и питивастатин (итавастатин/ризивастатин) (Nissan Chemical, Kowa Kogyo, Sankyo и Novartis). Иллюстративные фибраты включают, например, безафибрат (например, Befizal®/Cedur®/Bezalip® от Roche, Bezatol от Kissei), клофибрат (например, Atromid-S® от Wyeth), фенофибрат (например, Lipidil/Lipantil от Fournier, Tricor® от Abbott, Lipantil от Takeda, дженерики), гемфиброзил (например, Lopid/Lipur от Pfizer) и ципрофибрат (Modalin® от Sanofi-Synthelabo). Иллюстративные секвестранты желчных кислот включают, например, холестирамин (Questran® и Questran Light™ от Bristol-Myers Squibb), колестипол (например, Colestid от Pharmacia) и колесевелам (WelChol™ от Genzyme/Sankyo). Иллюстративные средства для терапии ниацином включают, например, составы с быстрым высвобождением, такие как Nicobid от Aventis, Niacor от Upsher-Smith, Nicolar от Aventis и Perycit от Sanwakagaku. Составы замедленного высвобождения с ниацином включают, например, Niaspan от Kos Pharmaceuticals и Slo-Niacin от Upsher-Smith. Иллюстративные антитромбоцитарные средства включают, например, аспирин (например, аспирин от Bayer), клопидогрель (Plavix от Sanofi-Synthelabo/Bristol-Myers Squibb) и тиклопидин (например, Ticlid от Sanofi-Synthelabo и Panaldine от Daiichi). Другие аспириноподобные соединения, применимые в комбинации с dsRNA, нацеливающимися на PCSK9, включают, например, Asacard (медленно высвобождающийся аспирин от Pharmacia) и памикогрель (Kanebo/Angelini Ricerche/CEPA). Иллюстративные ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента включают, например, рамиприл (например, Altace от Aventis) и эналаприл (например, Vasotec от Merck & Co.). Иллюстративные ингибиторы ацил-СоА:холестерин-ацилтрансферазы (АСАТ) включают, например, авазимиб (Pfizer), эфлюцимиб (BioMsriex Pierre Fabre/Eli Lilly), CS-505 (Sankyo и Kyoto) и SMP-797 (Sumito). Иллюстративные ингибиторы абсорбции холестерина включают, например, эзетимиб (Zetia® от Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals) и Pamaqueside (Pfizer). Иллюстративные ингибиторы СЕТР включают, например, торцетрапиб (также называемый CP-529414 от Pfizer), JTT-705 (Japan Tobacco) и CETi-I (Avant Immunotherapeutics). Иллюстративные ингибиторы микросомального белка-переносчика триглицеридов (МТТР) включают, например, имплитапид (Bayer), R-103757 (Janssen) и CP-346086 (Pfizer). Другие иллюстративные модуляторы холестерина включают, например, N0-1886 (Otsuka/TAP Pharmaceutical), CI-1027 (Pfizer) и WAY-135433 (Wyeth-Ayerst).

Иллюстративные модуляторы желчных кислот включают, например, HBS-107 (Hisamitsu/Banyu), Btg-511 (British Technology Group), BARI-1453 (Aventis), S-8921 (Shionogi), SD-5613 (Pfizer) и AZD-7806 (AstraZeneca). Иллюстративные агонисты рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR), включают, например, тезаглитазар (AZ-242) (AstraZeneca), нетоглитазон (MCC-555) (Mitsubishi/Johnson & Johnson), GW-409544 (Ligand Pharmaceuticals/GlaxoSmithKline), GW-501516 (Ligand Pharmaceuticals/GlaxoSmithKline), LY-929 (Ligand Pharmaceuticals и Eli Lilly), LY-465608 (Ligand Pharmaceuticals и Eli Lilly), LY-518674 (Ligand Pharmaceuticals и Eli Lilly) и МК-767 (Merck и Kyorin). Иллюстративные средства для генной терапии включают, например, AdGWEGF 121.10 (GenVec), ApoAI (UCB Pharma/Groupe Fournier), EG-004 (Trinam) (Ark Therapeutics) и АТР-связывающая кассета-транспортер-А1 (ABCA1) (CV Therapeutics/Incyte, Aventis, Xenon). Иллюстративные ингибиторы гликопротеина IIb/IIIa включают, например, роксифибан (также называемый DMP754, Bristol-Myers Squibb), гантофибан (Merck KGaA/Yamanouchi) и кромафибан (Millennium Pharmaceuticals). Иллюстративные ингибиторы скваленсинтазы включают, например, BMS-1884941 (Bristol-Myers Squibb), CP-210172 (Pfizer), CP-295697 (Pfizer), CP-294838 (Pfizer) и ТАК-475 (Takeda). Иллюстративным ингибитором MCP-I является, например, RS-504393 (Roche Bioscience). Противоатеросклеротическое средство BO-653 (Chugai Pharmaceuticals) и производное никотиновой кислоты Nuclin (Yamanouchi Pharmaceuticals) также подходят для введения в комбинации с dsRNA, представленной в настоящем изобретении. Иллюстративные средства комбинированной терапии, подходящие для введения с dsRNA, нацеливающимися на PCSK9, включают, например, адвикор (ниацин/ловастатин от Kos Pharmaceuticals), амлодипин/аторвастатин (Pfizer) и эзетимиб/симвастатин (например, таблетки Vytorin® с дозировкой 10/10, 10/20, 10/40 и 10/80, Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals). Средства для лечения гиперхолестеринемии и подходящие для введения в комбинации с dsRNA, нацеливающимися на PCSK9, включают, например, ловастатин, ниацин, ловастатин в

виде таблеток с пролонгированным действием Altoprev® (Andrx Labs), амлодипина безилат, аторвастатин кальция в виде таблеток Caduet® (Pfizer), розувастатин кальция в виде таблеток Crestor® (Astra-Zeneca), флувастатин натрия в виде капсул Lescol® (Novartis), флувастатин натрия в виде Lescol® (Reliant, Novartis), аторвастатин кальция в виде таблеток Lipitor® (Parke-Davis), капсулы Lofibra® (Gate), ниацин в виде таблеток с пролонгированным действием Ниаспан (Kos), правастатин натрия в виде таблеток Pravachol (Bristol-Myers Squibb), фенофибрат в виде таблеток TriCor® (Abbott), эзетимиб, симвастатин в виде таблеток Vytorin® с дозировкой 10/10 (Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals), колесевелама гидрохлорид в виде таблеток WelChol™ (Sankyo), эзетимиб в виде таблеток Zetia® (Schering), таблеток Zetia® (Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals) и эзетимиб в виде таблеток Zocor® (Merck).

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA вводят в комбинации с комбинацией эзетимиба/симвастатина (например, Vytorin® (Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals)).

В другом варианте осуществления средство на основе iRNA вводят в комбинации с антителом к PCSK9. Иллюстративные антитела к PCSK9 для применения в видах комбинированной терапии по настоящему изобретению включают, например, алирокумаб (Praluent), эволокумаб (Repatha), бокоцизумаб (PF-04950615, RN316, RN-316, L1L3; Pfizer, Rinat), лоделлизумаб (LFU720, pJG04; Novartis), ралпанцизумаб (RN317, PF-05335810; Pfizer, Rinat), RG7652 (MPSK3169A, YW508.20.33b; Genentech), LY3015014 (Lilly), LPD1462 (h1F11; Schering-Plough), AX1 (AX189, 1B20, 1D05; Merck & Co), ALD306 (Alder); mAb1 (Boehringer) и Ig1-PA4 (Nanjing Normal U.).

В одном варианте осуществления пациенту вводят средство на основе iRNA, а затем пациенту вводят дополнительное терапевтическое средство (или наоборот). В другом варианте осуществления средство на основе iRNA и дополнительное терапевтическое средство вводят одновременно.

В другом аспекте настоящего изобретения представлен способ инструктирования конечного пользователя, например лица, осуществляющего уход или лечение, или субъекта, в отношении того, как вводить средство на основе iRNA, описанное в данном документе. Способ включает необязательное обеспечение конечного пользователя одной или несколькими дозами средства на основе iRNA и инструктирование конечного пользователя в отношении введения средства на основе iRNA согласно схеме, описанной в данном документе, вследствие чего обеспечивается инструктирование конечного пользователя.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения пациента путем отбора пациента на основании того, что пациент нуждается в снижении уровня LDL, снижении уровня LDL без снижения уровня HDL, снижении уровня ApoB или снижении уровня общего холестерина. Способ включает введение пациенту siRNA в количестве, достаточном для снижения уровней LDL или уровней ApoB у пациента, например, без значительного снижения уровней HDL.

Генетическая предрасположенность играет роль в развитии ассоциированных с целевым геном заболеваний, например гиперлипидемии. Таким образом, пациента, нуждающегося в лечении с помощью siRNA, можно идентифицировать путем сбора семейного анамнеза или, например, скрининга в отношении одного или нескольких генетических маркеров или вариантов. Примеры генов, вовлеченных в гиперлипидемию, включают без ограничения, например, гены рецептора LDL (LDLR), аполипротеинов (ApoA1, ApoB, ApoE и т. п.), транспортного белка сложных эфиров холестерина (СЕТР), липопротеинлипазы (LPL), печеночной липазы (LIPC), эндотелиальной липазы (EL), лецитин:холестерин ацилтрансферазы (LCAT).

Медицинский работник, такой как врач, медицинская сестра, или член семьи могут собрать семейный анамнез перед назначением или введением средства на основе iRNA по настоящему изобретению. Кроме того, можно выполнить тест по определению генотипа или фенотипа. Например, можно выполнить ДНК-тест с образцом от пациента, например образцом крови, для идентификации генотипа и/или фенотипа по PCSK9 перед введением пациенту dsRNA к PCSK9. В другом варианте осуществления выполняют тест для идентификации связанного генотипа и/или фенотипа, например генотипа по LDLR. Примеры генетических вариантов гена LDLR можно найти в уровне техники, например, в следующих публикациях, которые включены посредством ссылки: Costanza et al (2005) Am J Epidemiol. 15;161(8):714-24; Yamada et al. (2008) J Med Genet. Jan;45(1):22-8, электронная публикация 31 августа 2007 г.; и Boes et al (2009) Exp. Gerontol 44: 136-160, электронная публикация 17 ноября 2008 г.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены способы ингибирования экспрессии протеинконвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9) в клетке, такой как клетка в организме субъекта, например, субъекта-человека.

Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены способы ингибирования экспрессии гена PCSK9 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со RNAi-средством, например двухнитевым RNAi-средством, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии гена PCSK9 в клетке, вследствие чего осуществляется ингибирование экспрессии PCSK9 в клетке.

Приведение клетки в контакт с двухнитевым RNAi-средством можно выполнять *in vitro* или *in vivo*. Приведение клетки в контакт со RNAi-средством *in vivo* включает приведение клетки или группы клеток в организме субъекта, например субъекта-человека, в контакт со RNAi-средством. Также возможны комбинации способов приведения в контакт *in vitro* и *in vivo*. Приведение в контакт может быть непосред-

венным или опосредованным, как обсуждалось выше. Более того, приведение клетки в контакт можно выполнять посредством нацеливающего лиганда, в том числе любого лиганда, описанного в данном документе или известного из уровня техники. В предпочтительных вариантах осуществления нацеливающий лиганд представляет собой углеводный фрагмент, например, лиганд GalNAc₃, или любой другой лиганд, который направляет RNAi-средство к сайту, представляющему интерес, например, печени субъекта.

Используемый в данном документе термин "ингибирование" используют взаимозаменяемо с "снижением", "сайленсингом", "понижающей регуляцией" и другими подобными терминами, и он включает любой уровень ингибирования.

Подразумевается, что фраза "ингибирование экспрессии PCSK9" обозначает ингибирование экспрессии любого гена PCSK9 (такого как, например, ген PCSK9 мыши, ген PCSK9 крысы, ген PCSK9 обезьяны или ген PCSK9 человека), а также вариантов или мутантов гена PCSK9. Таким образом, ген PCSK9 может быть геном PCSK9 дикого типа, мутантным геном PCSK9 или трансгенным геном PCSK9 в контексте клетки, группы клеток или организма, подвергнутых генетической манипуляции.

"Ингибирование экспрессии гена PCSK9" включает любой уровень ингибирования гена PCSK9, например, по меньшей мере, частичную супрессию экспрессии гена PCSK9. Экспрессию гена PCSK9 можно оценивать на основании уровня или изменения уровня любой переменной, ассоциированной с экспрессией гена PCSK9, например, уровня мРНК PCSK9, уровня белка PCSK9 или уровней липидов. Данный уровень можно оценивать в отдельной клетке или в группе клеток, в том числе, например, в образце, полученном от субъекта.

Ингибирование можно оценивать по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких переменных, которые ассоциированы с экспрессией PCSK9, по сравнению с контрольным уровнем. Контрольный уровень может представлять собой любой тип контрольного уровня, который используют в данной области техники, например, уровень в начальный момент времени до введения дозы или уровень, определенный у сходного субъекта, клетки или образца, являющихся необработанными или обработанными контролем (таким как, например, контроль только с буфером или контроль с неактивным средством).

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению экспрессия гена PCSK9 ингибируется по меньшей мере на приблизительно 5%, по меньшей мере на приблизительно 10%, по

меньшей мере на приблизительно 15%, по меньшей мере на приблизительно 20%, по меньшей мере на приблизительно 25%, по меньшей мере на приблизительно 30%, по меньшей мере на приблизительно 35%, по меньшей мере на приблизительно 40%, по меньшей мере на приблизительно 45%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 55%, по меньшей мере на приблизительно 60%, по меньшей мере на приблизительно 65%, по меньшей мере на приблизительно 70%, по меньшей мере на приблизительно 75%, по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 91%, по меньшей мере на приблизительно 92%, по меньшей мере на приблизительно 93%, по меньшей мере на приблизительно 94%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98% или по меньшей мере на приблизительно 99%.

Доказательством ингибирования экспрессии гена PCSK9 может служить снижение количества мРНК, экспрессируемой первой клеткой или группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном от субъекта), в которых транскрибируется ген PCSK9 и которую или которые подвергали обработке (например, путем приведения клетки или клеток в контакт со RNAi-средством по настоящему изобретению или путем введения RNAi-средства по настоящему изобретению субъекту, в организме которого клетки находятся или находились), за счет которой ингибируется экспрессия гена PCSK9, по сравнению со второй клеткой или группой клеток, практически идентичных первой клетке или группе клеток, но которую или которые не подвергали обработке (контрольная клетка(и)). В предпочтительных вариантах осуществления ингибирование оценивают путем выражения уровня мРНК в обработанных клетках как процентной доли от уровня мРНК в контрольных клетках с помощью следующей формулы: (мРНК в контрольных клетках) - (мРНК в обработанных клетках) / (мРНК в контрольных клетках).

В качестве альтернативы ингибирование экспрессии гена PCSK9 можно оценивать по снижению показателя, который функционально связан с экспрессией гена PCSK9, например, экспрессией белка PCSK9, как например, уровней липидов, уровней холестерина, например, уровней LDLc. Сайленсинг гена PCSK9 можно определять в любой клетке, которая экспрессирует PCSK9 либо конститутивно, либо за счет генной инженерии, и с помощью любого анализа, известного из уровня техники. Печень является главным местом экспрессии PCSK9. Другие важные места экспрессии включают поджелудочную железу, почку и кишечник.

Доказательством ингибирования экспрессии белка PCSK9 может служить снижение уровня белка PCSK9, который экспрессируется клеткой или группой клеток (например, уровня белка, экспрессируемо-

го в образце, полученном от субъекта). Как объяснялось выше в отношении оценки подавления экспрессии мРНК, ингибирование уровней экспрессии белка в обработанной клетке или группе клеток можно аналогично выражать как процентную долю уровня белка в контрольной клетке или группе клеток.

Контрольная клетка или группа клеток, которые можно использовать для оценки ингибирования экспрессии гена PCSK9, включают клетку или группу клеток, которые еще не были приведены в контакт со RNAi-средством по настоящему изобретению. Например, контрольная клетка или группа клеток могут быть получены от отдельного субъекта (например, субъекта-человека или субъекта-животного) перед лечением субъекта RNAi-средством.

Уровень мРНК PCSK9, которая экспрессируется клеткой или группой клеток, можно определять с помощью любого способа оценки экспрессии мРНК, известного из уровня техники. В одном варианте осуществления уровень экспрессии PCSK9 в образце определяют путем выявления транскрибированного полинуклеотида или его части, например, мРНК гена PCSK9. РНК можно извлекать из клеток с помощью методик извлечения РНК, в том числе, например, извлечения с помощью кислого фенола/гуанидинизотиоцианата (RNAzol B; Biogenesis), наборов для получения РНК RNeasy (Qiagen) или RAXgene (PreAnalytix, Швейцария). Типичные форматы анализов, в которых используется гибридизация рибонуклеиновых кислот, включают ядерные "run-on" анализы, RT-PCR, анализы с защитой от РНКаз (Melton et al., *Nuc. Acids Res.* 12:7035), нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ* и анализы с использованием микрочипов.

В одном варианте осуществления уровень экспрессии PCSK9 определяют с использованием зонда для нуклеиновой кислоты. Термин "зонд", используемый в данном документе, обозначает любую молекулу, которая способна к селективному связыванию со специфической PCSK9. Зонды могут быть синтезированы специалистом в данной области или получены из соответствующих биологических препаратов. Зонды можно специально разрабатывать так, чтобы они содержали метку. Примеры молекул, которые можно использовать в качестве зондов, включают без ограничения РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

Выделенную мРНК можно использовать в анализах на основе гибридизации или амплификации, которые включают без ограничения Саузерн-блоттинг или нозерн-блот-анализы, анализы на основе полимеразной цепной реакции (PCR) и анализы с применением матриц с зондами. Один способ определения уровней мРНК предусматривает приведение выделенной мРНК в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с мРНК PCSK9. В одном варианте осуществления мРНК иммобилизуют на твердой поверхности и приводят в контакт с зондом, например, путем прогона выделенной мРНК в агарозном геле и переноса мРНК из геля на мембрану, например, нитроцеллюлозную. В альтернативном варианте осуществления зонд(ы) иммобилизуют на твердой поверхности и мРНК приводят в контакт с зондом(ами), например на матрице GeneChip от Affymetrix. Специалист в данной области может легко адаптировать известные способы обнаружения мРНК для применения в определении уровня мРНК PCSK9.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии PCSK9 в образце предусматривает способ амплификации и/или обратной транскрипции нуклеиновой кислоты (с получением кДНК), например, из мРНК в образце, например, с помощью RT-PCR (экспериментальный вариант осуществления изложен в Mullis, 1987, патенте США № 4683202), лигазной цепной реакции (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), самоподдерживающейся репликации последовательности (Guatelli et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), системы транскрипционной амплификации (Kwoh et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), репликазы Q-бета (Lizardi et al. (1988) *Bio/Technology* 6:1197), репликации по типу "катящегося кольца" (Lizardi et al., патент США № 5854033), или любой другой способ амплификации нуклеиновой кислоты с последующим обнаружением амплифицированных молекул с помощью методик, хорошо известных специалистам в данной области. Такие схемы выявления особенно применимы для выявления молекул нуклеиновой кислоты, если такие молекулы присутствуют в очень малых количествах. В конкретных аспектах настоящего изобретения уровень экспрессии PCSK9 определяют с помощью количественной флуоресцентной RT-PCR (т. е. системы TaqMan™).

Уровни экспрессии мРНК PCSK9 можно контролировать с помощью мембранного блота (как, например, используемого в гибридизационном анализе, таком как нозерн-, Саузерн-, дот-блот анализ и т.п.) или микролунок, пробоотборных пробирок, гелей, гранул или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанные нуклеиновые кислоты). См. патенты США №№ 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены в данный документ посредством ссылки. Определение уровня экспрессии PCSK9 также может предусматривать использование зондов для нуклеиновой кислоты в растворе.

В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии мРНК оценивают с применением анализов с разветвленной ДНК (bdNA) или ПЦР в режиме реального времени (qPCR). Применение таких способов описано и проиллюстрировано в примерах, представленных в данном документе.

Уровень экспрессии белка PCSK9 можно определить с помощью любого способа измерения уровня белка, известного из уровня техники. Такие способы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), тонкослойную хромато-

графию (TLC), гипердиффузионную хроматографию, реакции преципитации в жидкости или геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одиночную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), иммунофлуоресцентные анализы, электрохемилюминисцентные анализы и т.п.

Термин "образец", используемый в данном документе, обозначает группу аналогичных жидкостей, клеток или тканей, выделенных из организма субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку крови и серозные жидкости, плазму крови, лимфу, мочу, спинномозговую жидкость, слюну, внутриглазные жидкости и т. п. Образцы ткани могут включать образцы из тканей, органов или ограниченных участков. Например, образцы могут быть получены из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток этих органов. В определенных вариантах осуществления образцы можно быть получены из печени (например, всей печени, или определенных сегментов печени, или определенных типов клеток в печени, таких как, например, гепатоциты). В предпочтительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" обозначает кровь или плазму крови, взятые у субъекта. В дополнительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" обозначает ткань печени, полученную от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению RNAi-средство вводят субъекту так, что RNAi-средство доставляется в специфический сайт в организме субъекта. Ингибирование экспрессии PCSK9 можно оценивать с помощью измерений уровня или изменения уровня мРНК PCSK9 или белка PCSK9 в образце, полученном из жидкости или ткани из специфического сайта в организме субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления сайтом является печень. Сайт также может представлять собой группу или подгруппу клеток из любого из указанных выше сайтов. Сайт также может включать клетки, которые экспрессируют конкретный тип рецептора.

III. iRNA для применения в способах по настоящему изобретению.

В данном документе описаны способы применения двухнитевых средств для RNAi, которые ингибируют экспрессию гена PCSK9 в клетке, такой как клетка в организме субъекта, например млекопитающего, как, например, человека, у которого имеется PCSK9-ассоциированное нарушение, например гиперлипидемия, например гиперхолестеринемия.

Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены двухнитевые RNAi-средства, способные ингибировать экспрессию целевого гена (т. е. гена PCSK9) *in vivo*, для применения в заявляемых способах.

В одном варианте осуществления РНК из числа iRNA по настоящему изобретению, например dsRNA, является немодифицированной и не содержит, например, химические модификации и/или конъюгации, известные из уровня техники и описанные в данном документе. В другом варианте осуществления РНК из числа iRNA по настоящему изобретению, например dsRNA, является химически модифицированной с целью улучшения стабильности или других полезных характеристик. В определенных аспектах настоящего изобретения практически все нуклеотиды iRNA по настоящему изобретению являются модифицированными. Например, практически все нуклеотиды смысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, и/или практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, и/или практически все нуклеотиды как смысловой нити, так и антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В других вариантах осуществления настоящего изобретения все нуклеотиды iRNA по настоящему изобретению являются модифицированными. Например, все нуклеотиды смысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, и/или все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, и/или все нуклеотиды как смысловой нити, так и антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. iRNA по настоящему изобретению, в которых "практически все нуклеотиды являются модифицированными", являются в значительной степени, но не полностью, модифицированными и могут включать не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида.

dsRNA содержит антисмысловую нить, имеющую участок комплементарности, который комплементарен по меньшей мере части мРНК, образующейся при экспрессии гена PCSK9. Длина участка комплементарности составляет приблизительно 30 нуклеотидов или меньше (например, длина составляет приблизительно 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19 или 18 нуклеотидов или меньше). После контакта с клеткой, экспрессирующей ген PCSK9, iRNA ингибирует экспрессию гена PCSK9 (например, гена PCSK9 человека) по меньшей мере на приблизительно 10%, как установлено анализом, например, с помощью способа с ПЦР или с использованием разветвленной ДНК (bdNA), или с помощью способа на основе анализа белка, как, например, с помощью иммунофлуоресцентного анализа с применением, например, методик вестерн-блоттинга или проточной цитометрии.

dsRNA содержит две нити РНК, которые являются комплементарными и гибридизируются с образованием дуплексной структуры при условиях, в которых dsRNA будет применяться. Одна нить dsRNA (антисмысловая нить) содержит участок комплементарности, который практически комплементарен и обычно полностью комплементарен целевой последовательности. Целевую последовательность можно

получить из последовательности мРНК, образующейся в процессе экспрессии гена PCSK9. Другая нить (смысловая нить) содержит участок, который комплементарен антисмысловой нити, за счет этого две нити гибридизируются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. Как описано в другом месте в данном документе и как известно из УРОВНЯ техники, комплементарные последовательности dsRNA также могут содержаться в виде самокомплементарных участков одной молекулы нуклеиновой кислоты, а не располагаться на отдельных олигонуклеотидах.

Как правило, длина дуплексной структуры составляет от 15 до 30 пар оснований, например, длина составляет 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований. Также предусматривается, что диапазоны и значения длины, промежуточные относительно вышеупомянутых диапазонов и значений длины, являются частью настоящего изобретения.

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

В некоторых вариантах осуществления длина dsRNA составляет от приблизительно 15 до приблизительно 20 нуклеотидов или длина составляет от приблизительно 25 до приблизительно 30 нуклеотидов. Как правило, dsRNA является достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для фермента Dicer. Например, как хорошо известно из уровня техники, dsRNA, длина которых составляет более приблизительно 21-23 нуклеотида, могут служить в качестве субстратов для Dicer. Специалисту в данной области также будет понятно, что участок РНК, являющийся целевым для расщепления, чаще всего будет частью более крупной молекулы РНК, зачастую молекулы мРНК. В соответствующих случаях "частью" мРНК-мишени является непрерывная последовательность мРНК-мишени, имеющая длину, достаточную для того, чтобы позволить ей быть субстратом для RNAi-направленного расщепления (т. е. расщепления посредством пути с участием RISC).

В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA по настоящему изобретению может содержать нить РНК (антисмысловую нить), которая может включать в себя более длинные отрезки, например, длиной до 66 нуклеотидов, например, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 нуклеотидов, с участком из по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, который практически комплементарен по меньшей мере части мРНК-транскрипта гена PCSK9. Эти средства на основе dsRNA с антисмысловыми нитями большей длины предпочтительно содержат вторую нить РНК (смысловую нить) длиной 20-60 нуклеотидов, где смысловая и антисмысловая нити образуют дуплекс из 18-30 смежных нуклеотидов.

Специалисту в данной области также будет понятно, что дуплексный участок представляет собой основную функциональную часть dsRNA, например, дуплексный участок из приблизительно 9-36 пар оснований, например, приблизительно 10-36, 11-36, 12-36, 13-36, 14-36, 15-36, 9-35, 10-35, 11-35, 12-35, 13-35, 14-35, 15-35, 9-34, 10-34, 11-34, 12-34, 13-34, 14-34, 15-34, 9-33, 10-33, 11-33, 12-33, 13-33, 14-33, 15-33, 9-32, 10-32, 11-32, 12-32, 13-32, 14-32, 15-32, 9-31, 10-31, 11-31, 12-31, 13-32, 14-31, 15-31, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пар оснований.

Таким образом, в тех случаях, когда она процессируется до функционального дуплекса, например, из 15-30 пар оснований, который нацеливается на требуемую РНК для расщепления, молекула РНК или комплекс молекул РНК, имеющие дуплексный участок размером более 30 пар оснований, представляют собой dsRNA. Таким образом, специалисту в данной области будет понятно, что в одном варианте осуществления miRNA представляет собой dsRNA. В другом варианте осуществления dsRNA представляет собой не встречающуюся в природе miRNA. В другом варианте осуществления средство на основе iRNA, применимое для нацеливания на экспрессию гена PCSK9, не образуется в целевой клетке при расщеплении более крупной dsRNA.

Описанная в данном документе dsRNA может дополнительно содержать один или несколько однонитевых нуклеотидных выступающих концов, например, из 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов. dsRNA, имеющие по меньшей мере один нуклеотидный выступающий конец, могут характеризоваться неожиданно более высокими ингибиторными свойствами по сравнению с их аналогами с тупыми концами. Нуклеотидный выступающий конец может содержать аналог нуклеотида/нуклеозида, в том числе дезокси-нуклеотид/нуклеозид, или состоять из него. Выступающий конец(ы) может находиться на смысловой нити, антисмысловой нити или любой их комбинации. Более того, нуклеотид(ы) выступающего конца может присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах антисмысловой или смысловой нити dsRNA. В

определенных вариантах осуществления возможны более длинные, удлиненные выступающие концы.

dsRNA можно синтезировать с помощью стандартных способов, известных из уровня техники и дополнительно обсуждаемых ниже, например, с применением автоматического синтезатора ДНК, такого как, например, коммерчески доступный от Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

Соединения на основе iRNA по настоящему изобретению можно получать с применением двухстадийной процедуры. Вначале отдельные нити молекулы двухнитевой РНК получают отдельно. Затем составляющие нити гибридизируют. Отдельные нити соединения на основе siRNA можно получать с применением жидкофазного или твердофазного органического синтеза или их обоих. Преимущество органического синтеза в том, что можно легко получать олигонуклеотидные нити, содержащие не встречающиеся в природе или модифицированные нуклеотиды. Однонитевые олигонуклеотиды по настоящему изобретению можно получать с применением жидкофазного или твердофазного органического синтеза или их обоих.

В одном аспекте dsRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность. Смысловая нить выбрана из группы последовательностей, представленных в табл.1, а соответствующая смысловой нити антисмысловая нить выбрана из группы последовательностей из табл.1. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, при этом одна из последовательностей практически комплементарна последовательности мРНК, образуемой при экспрессии гена PCSK9. В связи с этим, в этом аспекте dsRNA будет содержать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описывается как смысловая нить в табл.1, а второй олигонуклеотид описывается как соответствующая смысловой нити антисмысловая нить в табл.1. В одном варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся на отдельных олигонуклеотидах. В другом варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся на одном олигонуклеотиде.

Будет понятно, что хотя некоторые из последовательностей из табл.1 описаны как модифицированные и/или конъюгированные последовательности, РНК из числа iRNA по настоящему изобретению, например, dsRNA по настоящему изобретению, может содержать любую из последовательностей, изложенных в табл.1, которая является немодифицированной, неконъюгированной, и/или модифицированной, и/или конъюгированной иным образом, чем описано там.

Специалисту в данной области хорошо известно, что dsRNA с дуплексной структурой из приблизительно 20-23 пар оснований, например, из 21 пары оснований, были признаны особенно эффективными для индукции РНК-интерференции (Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888). Тем не менее, другие авторы обнаружили, что более короткие или более длинные дуплексные структуры РНК также могут быть эффективными (Chu and Rana (2 007) RNA 14:1714-1719; Kim et al. (2005) Nat Biotech 23:222-226). В вариантах осуществления, описанных выше, в силу природы олигонуклеотидных последовательностей, представленных в табл. 1, dsRNA, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере одну нить длиной не менее 21 нуклеотида. С достаточной вероятностью можно ожидать, что более короткие дуплексы, имеющие одну из последовательностей из табл.1 за вычетом лишь нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, могут быть так же эффективны в сравнении с описанными выше dsRNA. Следовательно, dsRNA, имеющие последовательность, состоящую по меньшей мере из 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей из любой из табл.3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23, и отличающиеся по своей способности ингибировать экспрессию гена PCSK9 не более чем на приблизительно 5, 10, 15, 20, 25 или 30% от ингибирования под действием dsRNA, содержащей полную последовательность, предусматриваются как находящиеся в пределах объема настоящего изобретения.

Кроме того, РНК, представленные в табл.1, идентифицируют сайт(ы) в PCSK9-транскрипте, который поддается RISC-опосредованному расщеплению. Таким образом, в настоящем изобретении дополнительно представлены iRNA, которые нацеливаются на один из этих сайтов. Как используется в данном документе, говорится, что iRNA нацеливается на конкретный сайт РНК-транскрипта, если iRNA способствует расщеплению транскрипта в любом месте этого конкретного сайта. Такая iRNA будет, как правило, содержать по меньшей мере приблизительно 15 смежных нуклеотидов из одной из последовательностей, представленных в табл.1, соединенных с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из участка, смежного с выбранной последовательностью в гене PCSK9.

Хотя длина целевой последовательности, как правило, составляет приблизительно 15-30 нуклеотидов, существует большая изменчивость в отношении пригодности конкретных последовательностей в этом диапазоне для управления расщеплением любой заданной целевой РНК. Различные пакеты программного обеспечения и принципы, изложенные в данном документе, предоставляют руководство по идентификации оптимальных целевых последовательностей для любого заданного гена-мишени, но также можно применять эмпирический подход, при котором "окно" или "маску" заданного размера (в качестве неограничивающего примера длиной 21 нуклеотид) буквально или фигурально (в том числе, например, *in silico*), помещают на последовательность целевой РНК для идентификации последовательностей в такой диапазоне размеров, которые могут служить в качестве целевых последовательностей. Постепенно

перемещая "окно" последовательности на один нуклеотид выше или ниже исходного положения целевой последовательности, можно идентифицировать следующую потенциальную целевую последовательность, пока не будет идентифицирован полный набор возможных последовательностей для любого выбранного заданного целевого размера. С помощью этого способа в сочетании с систематическим синтезом и тестированием идентифицированных последовательностей (с применением анализов, описанных в данном документе или известных из уровня техники) для идентификации последовательностей с оптимальными характеристиками можно идентифицировать те последовательности РНК, при нацеливании на которых средства на основе iRNA, опосредуется наилучшее ингибирование экспрессии целевого гена. Таким образом, хотя последовательности, идентифицированные, например, в табл.1, представляют собой эффективные целевые последовательности, предусматривается, что дополнительная оптимизация эффективности ингибирования может быть достигнута путем постепенного "перемещения окна" на один нуклеотид выше или ниже относительно заданных последовательностей для идентификации последовательностей с такими же или лучшими характеристиками ингибирования.

Дополнительно предусматривается, что для любой идентифицированной последовательности, например, в табл.1, дополнительной оптимизации можно достичь путем систематического добавления или удаления нуклеотидов с получением более длинных или более коротких последовательностей и тестирования таких последовательностей, полученных путем передвижения окна более длинного или более короткого размера выше или ниже по целевой РНК от данной точки. Также объединение этого подхода для получения новых мишеней-кандидатов с тестированием эффективности iRNA на основе этих целевых последовательностей в анализе ингибирования, известном из уровня техники или описанном в данном документе, может приводить к дополнительным улучшениям в эффективности ингибирования. Более того, такие оптимизированные последовательности можно корректировать, например, посредством введения модифицированных нуклеотидов, описанных в данном документе или известных из уровня техники, добавления или изменений выступающего конца или других модификаций, известных из уровня техники и/или обсуждаемых в данном документе, для дополнительной оптимизации молекулы (например, для повышения стабильности в сыворотке крови или увеличения периода полужизни в кровотоке, повышения термостабильности, улучшения трансмембранной доставки, нацеливания на конкретное местоположение или тип клеток, повышения степени взаимодействия с ферментами пути сайленсинга, повышения высвобождения из эндосом) в качестве ингибитора экспрессии.

iRNA, как описано в данном документе, может содержать одну или, несколько ошибок спаривания с целевой последовательностью. В одном варианте осуществления iRNA, описанная в данном документе, содержит не более 3 ошибок спаривания. Если антисмысловая нить iRNA содержит ошибки спаривания с целевой последовательностью, предпочтительно, чтобы область с ошибкой спаривания не находилась в центре участка комплементарности. Если антисмысловая нить iRNA содержит ошибки спаривания с целевой последовательностью, предпочтительно, чтобы ошибка спаривания была ограничена нахождением в пределах последних 5 нуклеотидов либо от 5'-, либо от 3'-конца участка комплементарности. Например, в случае средства на основе iRNA из 23 нуклеотидов нить, которая комплементарна участку гена PCSK9, обычно не содержит ни одной ошибки спаривания в пределах центральных 13 нуклеотидов. Способы, описанные в данном документе, или способы, известные из УРОВНЯ ТЕХНИКИ, можно применять для определения того, эффективна ли iRNA, содержащая ошибку спаривания с целевой последовательностью, в ингибировании экспрессии гена PCSK9. Рассмотрение эффективности iRNA с ошибками спаривания с точки зрения ингибирования экспрессии гена PCSK9 является важным, особенно, если известно, что конкретный участок комплементарности в гене PCSK9 характеризуется полиморфной изменчивостью последовательности в пределах популяции.

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

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

Иллюстративные патенты США, в которых изложено получение вышеупомянутых содержащих фосфор связей, включают без ограничения патенты США №№ 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177195; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541316; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361; 5625050; 6028188; 6124445; 6160109; 6169170; 6172209; 6239265; 6277603; 6326199; 6346614; 6444423; 6531590; 6534639; 6608035; 6683167; 6858715; 6867294; 6878805; 7015315; 7041816; 7273933; 7321029 и патентный документ США RE39464, полное содержание каждого из которых включено настоящим в данный документ посредством ссылки.

Модифицированные остовы РНК, которые не содержат атом фосфора в своем составе, представляют собой остовы, образованные короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомными и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями или одной или несколькими короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. Они включают остовы с морфолиновыми связями (частично образованные из сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы; алкенсодержащие остовы; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленигидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы и другие, содержащие смесь составляющих частей N, O, S и CH₂.

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

В других вариантах осуществления для применения в iRNA предусматриваются подходящие РНК-миметики, у которых как сахар, так и межнуклеозидная связь, т. е. остов, нуклеотидных структурных единиц, заменены новыми группами. Структурные единицы в виде оснований сохранены для гибридизации с соответствующим целевым соединением нуклеиновой кислоты. Одно такое олигомерное соединение, РНК-миметик, который, как было показано, обладает превосходными свойствами гибридизации, обозначен как пептидная нуклеиновая кислота (PNA). В соединениях PNA сахарный остов РНК заменен на амидсодержащий остов, в частности аминокислотный остов. Нуклеиновые основания оставлены, и они связываются непосредственно или опосредованно с атомами азота азатрупа амидной части остова. Иллюстративные патенты США, в которых изложено получение соединений PNA, включают без ограничения патенты США №№ 5539082; 5714331 и 57192 62, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки. Дополнительные соединения PNA, подходящие для применения в iRNA по настоящему изобретению, описаны, например, в Nielsen et al. , Science, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления, представленные в настоящем изобретении, включают РНК с фосфотиоатными остовами и олигонуклеозиды с гетероатомными остовами и, в частности, --CH₂--NH--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂-- [известный как метилен (метиляминовый) или MMI-остов] , --CH₂--O--N(CH₃) --CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- и --N(CH₃)--CH₂ -- CH₂-- [где нативный фосфодизэфирный остов представлен как --O--P--O--CH₂--] из вышеупомянутого патента США № 5489677 и амидные остовы из вышеупомянутого патента США № 5602240. В некоторых вариантах осуществления РНК, представленные в данном документе, имеют морфолиновые структуры остова из вышеупомянутого патента США № 5034506.

Модифицированные РНК также могут содержать один или несколько замещенных сахарных фрагментов. iRNA, например dsRNA, представленные в данном документе, могут содержать в 2'-положении одно из следующего: OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут представлять собой замещенный или незамещенный C₁-C₁₀алкил или C₂-C₁₀алкенил и алкинил. Иллюстративные подходящие модификации включают O[(CH₂)_nO]_mCH₃, (CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ и O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, где n и m равняются от 1 до приблизительно 10. В других вариантах осуществления dsRNA содержат в 2'-положении одно из следующего: низший C₁-C₁₀алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминокислотамино, полиалкиламино, замещенный силлил, расще-

плюющую РНК группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств iRNA или группу для улучшения фармакодинамических свойств iRNA и другие заместители с аналогичными свойствами. В некоторых вариантах осуществления модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), т.е. алкоксиалкоксигруппу. Другой иллюстративной модификацией является 2'-диметиламинооксиэтокси, т.е. группа O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, также известная как 2'-DMAOE, описанная в примерах в данном документе ниже, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известная из уровня техники как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), т.е. 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂.

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH₃), 2'-аминопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) и 2'-фтор (2'-F). Подобные модификации также могут быть осуществлены в других положениях в РНК из числа iRNA, в частности в 3'-положении сахара в 3'-концевом нуклеотиде или в dsRNA с 2'-5'-связями и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. iRNA также могут содержать миметики сахаров, такие как циклобутильные фрагменты, вместо пентофуранозильного сахара. Иллюстративные патенты США, в которых изложено получение таких модифицированных сахарных структур, включают без ограничения патенты США №№ 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633 и 5700920, некоторые из которых принадлежат авторам настоящей заявки. Полное содержание каждого из вышеупомянутых источников настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

РНК из числа iRNA также может содержать модификации или замещения нуклеинового основания (часто называемого в данной области просто как "основание"). Используемые в данном документе "немодифицированные" или "природные" нуклеиновые основания включают пуриновые основания аденин (A) и гуанин (G) и пиримидиновые основания тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные нуклеиновые основания включают другие синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как дезокситимин (dT), 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксицитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил- и другие алкил-производные аденина и гуанина, 2-пропил- и другие алкил-производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил и -цитозин, 5-пропинилурацил и -цитозин, 6-азоурацил, -цитозин и -тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген-, в частности 5-бром-, 5-трифторметил- и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-деазааденин, а также 3-деазагуанин и 3-деазааденин.

Дополнительные нуклеиновые основания включают такие, которые раскрыты в патенте США № 3687808, такие, которые раскрыты в *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; такие, которые раскрыты в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, pages 858-859, Kroschwitz, J. L., ed. John Wiley & Sons, 1990, такие, которые раскрыты в *Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613, и такие, которые раскрыты в *Sanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications*, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из этих нуклеиновых оснований особенно применимы для повышения аффинности связывания олигомерных соединений, представленных в настоящем изобретении. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2-, N-6- и 0-6-замещенные пурины, в том числе 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что 5-метилцитозиновые замещения повышают стабильность дуплекса нуклеиновых кислот на 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., *dsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278), и они представляют собой иллюстративные замещения оснований, еще более конкретно в сочетании с 2'-O-метоксиэтиловыми модификациями сахаров.

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

РНК из числа iRNA также может быть модифицирована таким образом, чтобы она содержала один или несколько бициклических сахарных фрагментов. "Бициклический сахар" представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное путем формирования мостика между двумя атомами. "Бициклический нуклеозид" ("BNA") представляет собой нуклеозид, имеющий сахарный фрагмент, содержащий мостик, соединяющий два атома углерода сахарного кольца, вследствие чего образуется бициклическая кольцевая система. В определенных вариантах осуществления мостик соединяет 4'-атом углерода и 2'-атом углерода в сахарном кольце. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления средство по настоящему изобретению может содержать РНК из числа iRNA, которая также может быть модифицирована таким образом, чтобы содержать одну или несколько запертых нуклеиновых кислот (LNA).

Запертая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, содержащий модифицированный ри-

бозный фрагмент, где рибозный фрагмент содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-атомы углерода. Другими словами, LNA представляет собой нуклеотид, содержащий бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH₂-O-2'. Эта структура эффективно "запирает" рибозу в структурной конформации 3'-эндо. Было показано, что добавление запертых нуклеиновых кислот в siRNA повышает стабильность siRNA в сыворотке крови и снижает нецелевые эффекты (Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids Research* 33 (1): 439-447; Mook, OR. et al., (2007) *Mol Canc Ther* 6 (3): 833-843; Grunweller, A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31 (12):3185-3193).

Примеры бициклических нуклеозидов для применения в полинуклеотидах по настоящему изобретению включают без ограничения нуклеозиды, содержащие мостик между 4'- и 2'-атомами кольца рибозы. В определенных вариантах осуществления средства на основе антисмысловых полинуклеотидов по настоящему изобретению содержат один или несколько бициклических нуклеозидов, содержащих мостик 4'-2'. Примеры таких бициклических нуклеозидов с мостиком 4'-2' включают без ограничения 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (также называемый "конформационно затрудненный этилом" или "сEt") и 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 7399845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278283); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278425); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (см., например, публикацию заявки на патент США № 2004/0171570); 4'-CH₂-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C₁-C₁₂алкил или защитную группу (см., например, патент США № 7427672); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (см., например, Chattopadhyaya et al., *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134) и 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278426). Полное содержание каждого из вышеупомянутых источников настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

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

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

РНК из числа iRNA также может быть модифицирована таким образом, чтобы она содержала один или несколько затрудненных этилом нуклеотидов. Используемый в данном документе "затрудненный этилом нуклеотид" или "сEt" представляет собой запертую нуклеиновую кислоту, содержащую бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH(CH₃)-O-2'. В одном варианте осуществления затрудненный этилом нуклеотид находится в S-конформации, обозначаемой в данном документе "S-сEt".

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

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

Один или несколько нуклеотидов iRNA по настоящему изобретению также могут включать гидроксиметилзамещенный нуклеотид. "Гидроксиметилзамещенный нуклеотид" представляет собой ациклический 2'-3'-секонуклеотид, также обозначаемый как модификация "незапертая нуклеиновая кислота" ("UNA").

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

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

Потенциально стабилизирующие модификации на концах молекул РНК могут включать N-(ацетиламинокапроил)-4-гидроксипропинол (Нур-С6-NHAc), N-капроил-4-гидроксипропинол (Нур-С6), N-ацетил-4-гидроксипропинол (Нур-NHAc), тимидин-2'-0-дезокситимидин (простой эфир), N-(аминокапроил)-4-гидроксипропинол (Нур-С6-амино), 2-докозаноилуридин-3"-фосфат, инвертированное основание dT (idT) и другие. Раскрытие этой модификации можно найти в публикации согласно PCT №

WO 2011/005861.

А. Модифицированные iRNA, содержащие мотивы.

В определенных аспектах настоящего изобретения двухнитевые RNAi-средства по настоящему изобретению включают средства с химическими модификациями, которые раскрыты, например, в публикации заявки на патент США № 2014/0315835 и публикации согласно РСТ № WO 2013/075035, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки. Как показано в данном документе, а также в публикации заявки на патента США № 2014/0315835 и публикации согласно РСТ № WO 2013/075035, превосходный результат можно получить путем введения одного или нескольких мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в смысловую нить и/или антисмысловую нить RNAi-средства, в частности в сайт расщепления или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить RNAi-средства могут быть полностью модифицированы иным способом. Введение таких мотивов нарушает паттерн модификаций, если он имеется, смысловой и/или антисмысловой нити. RNAi-средство может быть необязательно конъюгировано с лигандом, представляющим собой производное GalNAc, например, посредством смысловой нити. Полученные RNAi-средства демонстрируют превосходную активность в отношении сайленсинга генов.

Более конкретно, неожиданно было обнаружено, что в тех случаях, когда смысловая нить и антисмысловая нить двухнитевого RNAi-средства полностью модифицированы так, что имеют один или несколько мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления по меньшей мере одной нити RNAi-средства или рядом с ним, тогда активность RNAi-средства в отношении сайленсинга генов была наилучшим образом повышена.

Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены двухнитевые RNAi-средства, способные ингибировать экспрессию целевого гена (т. е. гена PCSK9) *in vivo*. RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить. Длина каждой нити RNAi-средства может варьироваться от 12 до 30 нуклеотидов. Например, длина каждой нити может составлять 14-30 нуклеотидов, 17-30 нуклеотидов, 25-30 нуклеотидов, 27-30 нуклеотидов, 17-23 нуклеотида, 17-21 нуклеотид, 17-19 нуклеотидов, 19-25 нуклеотидов, 19-23 нуклеотида, 19-21 нуклеотид, 21-25 нуклеотидов или 21-23 нуклеотида.

Смысловая нить и антисмысловая нить, как правило, образуют двухнитевой РНК-дуплекс ("dsRNA"), также обозначаемый в данном документе как "RNAi-средство". Длина дуплексного участка RNAi-средства может составлять 12-30 пар нуклеотидов. Например, длина дуплексного участка может составлять 14-30 пар нуклеотидов, 17-30 пар нуклеотидов, 27-30 пар нуклеотидов, 17-23 пары нуклеотидов, 17-21 пару нуклеотидов, 17-19 пар нуклеотидов, 19-2 5 пар нуклеотидов, 19-2 3 пары нуклеотидов, 19-21 пару нуклеотидов, 21-25 пар нуклеотидов или 21-23 пары нуклеотидов. В другом примере длина дуплексного участка выбрана из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 нуклеотидов.

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

В одном варианте осуществления каждый из нуклеотидов в участке выступающего конца RNAi-средства независимо может представлять собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, в том числе без ограничения с 2'-модифицированным сахаром, такой как 2'-F-, 2'-O-метилтимидин (Т), 2''-O-метоксиэтил-5-метилуридин (Тео), 2''-O-метоксиэтиладенозин (Аео), 2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин (m5Cео) и их любые комбинации. Например, последовательность выступающего конца на обоих концах каждой нити может представлять собой ТТ. Выступающий конец может образовывать ошибку спаривания с целевой мРНК, или он может быть комплементарен последовательностям генов, подлежащим нацеливанию, или может иметь другую последовательность.

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

RNAi-средство может содержать только один выступающий конец, который может усиливать активность интерференции у RNAi-средства без негативного воздействия на его общую стабильность. Например, однонитевой выступающий конец может быть расположен на 3'-конце смысловой нити или в

качестве альтернативы на 3'-конце антисмысловой нити. RNAi также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой нити (или 3'-конце смысловой нити) или наоборот. Как правило, антисмысловая нить RNAi имеет нуклеотидный выступающий конец на 3'-конце, а 5'-конец является тупым концом. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, предполагают, что асимметричные тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити и 3'-концевой выступающий конец антисмысловой нити способствуют включению направляющей нити в процесс с участием RISC.

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

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

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

В одном варианте осуществления RNAi-средство содержит смысловую нить из 21 нуклеотида и антисмысловую нить из 23 нуклеотидов, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца; антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца, где один конец RNAi-средства является тупым, в то время как другой конец содержит выступающий конец из 2 нуклеотидов. Предпочтительно выступающий конец из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити. В тех случаях, когда выступающий конец из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити, между тремя концевыми нуклеотидами могут быть две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из этих трех нуклеотидов являются нуклеотидами выступающего конца, а третий нуклеотид является образующим пару нуклеотидом, следующим за нуклеотидом выступающего конца. В одном варианте осуществления RNAi-средство дополнительно содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити. В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити RNAi-средства, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, представляет собой модифицированный нуклеотид. В одном варианте осуществления каждый остаток является независимо модифицированным с помощью 2'-О-метила или 3'-фтора, например, в виде чередующегося мотива. Необязательно RNAi-средство дополнительно содержит лиганд (предпочтительно GaNAc₃).

В одном варианте осуществления RNAi-средство содержит смысловую и антисмысловую нить, где длина смысловой нити составляет 25-30 нуклеотидных остатков, в которой, начиная с 5'-концевого нуклеотида (положения 1), в положениях 1-23 первой нити содержатся по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; длина антисмысловой нити составляет 36-66 нуклеотидных остатков и, начиная с 3'-концевого нуклеотида, содержится по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1-23 смысловой нити с образованием дуплекса; где по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой нити является неспаренным со смысловой нитью и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов являются неспаренными со смысловой нитью, вследствие чего образуется одонитевой 3'-выступающий конец из 1-6 нуклеотидов; где 5'-конец антисмысловой нити содержит 10-30 последовательных нуклеотидов, неспаренных со смысловой нитью, вследствие чего образуется одонитевой 5'-выступающий конец из 10-30 нуклеотидов; где по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой нити образуют пары оснований с нуклеотидами антисмысловой нити, когда смысловая и антисмысловая нити выравниваются для обеспечения максимальной комплементарности, вследствие чего образуется практически дуплексный участок между смысловой и антисмысловой нитями; и антисмысловая нить в достаточной степени комплементарна целевой РНК на протяжении по меньшей мере 19 рибонуклеотидов антисмысловой нити в длину, чтобы снизить экспрессию целевого гена при введении двухнитевой нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах, при этом по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления или рядом с ним. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления или рядом с ним.

В одном варианте осуществления RNAi-средство содержит смысловую и антисмысловую нити, где RNAi-средство содержит первую нить, длина которой составляет по меньшей мере 25 и не более 29 нук-

леотидов, и вторую нить, длина которой составляет не более 30 нуклеотидов, по меньшей мере с одним мотивом из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положении 11, 12, 13 от 5'-конца; где 3'-конец первой нити и 5'-конец второй нити образуют тупой конец, а вторая нить на своем 3'-конце на 1-4 нуклеотида длиннее, чем первая нить, где длина дуплексного участка составляет по меньшей мере 25 нуклеотидов, а вторая нить в достаточной степени комплементарна целевой мРНК на протяжении по меньшей мере 19 нуклеотидов длины второй нити, чтобы снизить экспрессию целевого гена, где RNAi-средство вводят в клетку млекопитающего, и где расщепление RNAi-средства под действием Dicer предпочтительно приводит к siRNA, содержащей 3'-конец второй нити, вследствие чего обеспечивается снижение экспрессии целевого гена у млекопитающего. Необязательно RNAi-средство дополнительно содержит лиганд.

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

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

В случае RNAi-средства с дуплексным участком, длина которого составляет 17-23 нуклеотида, сайт расщепления антисмысловой нити обычно находится около положений 10, 11 и 12 от 5'-конца. Таким образом, мотивы из трех идентичных модификаций могут находиться в положениях 9, 10, 11; положениях 10, 11, 12; положениях 11, 12, 13; положениях 12, 13, 14 или положениях 13, 14, 15 антисмысловой нити, при этом отсчет начинается с 1^{го} нуклеотида от 5'-конца антисмысловой нити, или отсчет начинается с 1^{го} спаренного нуклеотида от 5'-конца в пределах дуплексного участка антисмысловой нити. Сайт расщепления в антисмысловой нити может также изменяться в соответствии с длиной дуплексного участка RNAi-средства от 5'-конца.

Смысловая нить RNAi-средства может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления нити; а антисмысловая нить может иметь по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления нити или рядом с ним. Когда смысловая нить и антисмысловая нить образуют dsRNA-дуплекс, смысловая нить и антисмысловая нить могут выравниваться таким образом, что один мотив из трех нуклеотидов в смысловой нити и один мотив из трех нуклеотидов в антисмысловой нити имеют перекрытие по меньшей мере в один нуклеотид, т. е. по меньшей мере один из трех нуклеотидов мотива в смысловой нити образует пару оснований по меньшей мере с одним из трех нуклеотидов мотива в антисмысловой нити. В качестве альтернативы по меньшей мере два нуклеотида могут перекрываться или все три нуклеотида могут перекрываться.

В одном варианте осуществления смысловая нить RNAi-средства может содержать более одного мотива из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах. Первый мотив может находиться в сайте расщепления нити или рядом с ним, а другие мотивы могут представлять собой фланкирующую модификацию. Термин "фланкирующая модификация" в данном документе обозначает мотив, находящийся в другой части нити, которая отделена от мотива, находящегося в сайте расщепления или рядом с ним на той же нити. Фланкирующая модификация либо прилегает к первому мотиву, либо отделена от него по меньшей мере одним или несколькими нуклеотидами. Когда мотивы непосредственно прилегают друг к другу, мотивы отличаются друг от друга по химической структуре, а когда мотивы разделены одним или несколькими нуклеотидами, то они могут быть одинаковыми или разными по химической структуре. Могут присутствовать две или более фланкирующие модификации. Например, если присутствуют две фланкирующие модификации, то каждая фланкирующая модификация может встречаться на одном конце относительно первого мотива, находящегося в сайте расщепления или рядом с ним, или с обеих сторон основного мотива.

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

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

В другом варианте осуществления фланкирующая модификация в смысловой нити или антисмысловой нити RNAi-средства обычно не включает один или два первых спаренных нуклеотида в пределах дуплексного участка на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах нити.

Когда каждая из смысловой нити и антисмысловой нити RNAi-средства содержит по меньшей мере одну фланкирующую модификацию, тогда фланкирующие модификации могут попадать на один и тот же конец дуплексного участка и иметь перекрытие в один, два или три нуклеотида.

Когда каждая из смысловой нити и антисмысловой нити RNAi-средства содержит по меньшей мере две фланкирующие модификации, тогда смысловая нить и антисмысловая нить могут выравниваться таким образом, что две модификации, каждая от одной нити, попадают на один конец дуплексного участка с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации, каждая от одной нити, попадают на другой конец дуплексного участка с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации одной нити попадают по обеим сторонам от основного мотива с перекрытием в один, два или три нуклеотида в дуплексном участке.

В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити RNAi-средства, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, могут быть модифицированными. Каждый нуклеотид может быть модифицированным с помощью одинаковой или разной модификации, которые могут включать одно или несколько изменений одного или обоих не связанных с фосфатом атомов кислорода и/или одного или нескольких связанных с фосфатом атомов кислорода; изменение компонента рибозного сахара, например, 2'-гидроксила в рибозном сахаре; полную замену фосфатного фрагмента "дефосфорилированными" линкерами; модификацию или замену встречающегося в природе основания и замену или модификацию рибозофосфатного остова.

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

Существует возможность, например, для повышения стабильности, включения конкретных оснований в выступающие концы или включения модифицированных нуклеотидов или имитаторов нуклеотидов в одонитевые выступающие концы, например, в 5'- или 3'-выступающий конец или в оба. Например, может быть желательно включить пуриновые нуклеотиды в выступающие концы. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые основания в 3'- или 5'-выступающем конце могут быть модифицированы, например, с помощью модификации, описанной в данном документе. Модификации могут включать, например, применение модификаций в 2'-положении рибозного сахара с модификациями, известными из уровня техники, например, применение дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезоксидеокси-2'-фтор-(2'-F)-или 2'-О-метил-модифицированного вместо рибозного сахара нуклеинового основания, а также модификации в фосфатной группе, например, фосфотиоатные модификации. Выступающие концы необязательно должны быть гомологичными с целевой последовательностью.

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

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

В одном варианте осуществления N_a и/или N_b содержат модификации в виде чередующегося паттерна. Термин "чередующийся мотив", используемый в данном документе, обозначает мотив с одной или несколькими модификациями, при этом каждая модификация встречается в чередующихся нуклеотидах одной нити. Чередующийся нуклеотид может обозначать каждый второй нуклеотид или каждый третий нуклеотид или аналогичный паттерн. Например, если каждый из А, В и С представляет собой один тип модификации в нуклеотиде, то чередующийся мотив может представлять собой "АВАВАВАВАВАВ...", "ААВВААВВААВВ..." , "ААВААВААВААВ...", "АААВАААВАААВ...", "АААВВВАААВВВ..." или "АВСАВСАВСАВС..." и т.д.

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

В одном варианте осуществления для RNAi-средства по настоящему изобретению предусмотрено, что паттерн модификаций для чередующегося мотива на смысловой нити сдвинут относительно паттерна модификации для чередующегося мотива на антисмысловой нити. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой нити соответствует группе нуклеотидов антисмысловой нити, модифицированной другим способом, и наоборот. Например, при спаривании смысловой нити с антисмысловой нитью в dsRNA-дуплексе чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "АВАВАВ" от 5'- к 3'-концу нити, а чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с "ВАВАВА" от 5'- к 3'-концу нити в пределах дуплексного участка. В качестве другого примера чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "ААВВААВВ" от 5'- к 3'-концу нити, а чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с "ВВААВВАА" от 5'- к 3'-концу нити в пределах дуплексного участка, так что между смысловой нитью и антисмысловой нитью существует полный или частичный сдвиг паттернов модификаций.

В одном варианте осуществления для RNAi-средства предусмотрено, что оно изначально имеет сдвиг паттерна чередующегося мотива из 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в смысловой нити относительно паттерна чередующегося мотива из 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в антисмысловой нити, т. е. 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид в смысловой нити образует пары оснований с 2'-F-модифицированным нуклеотидом в антисмысловой нити и наоборот. Положение 1 в смысловой нити может начинаться с 2'-F-модификации, а 1 положение в антисмысловой нити может начинаться с 2'-О-метил-модификации.

Введение одного или нескольких мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в смысловую нить и/или антисмысловую нить нарушает исходный паттерн модификаций, присутствующий в смысловой нити и/или антисмысловой нити. Такое нарушение паттерна модификаций смысловой и/или антисмысловой нити путем введения одного или нескольких мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в смысловую и/или антисмысловую нить неожиданным образом повышает активность сайленсинга генов в отношении целевого гена.

В одном варианте осуществления, когда мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах вводят в любую из нитей, модификация нуклеотида, следующего за мотивом, является модификацией, отличной от модификации мотива. Например, часть последовательности, содержащей мотив, представляет собой "...N_aY₁Y₂N_b...", где "Y" представляет собой модификацию в виде мотива из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, а "N_a" и "N_b" представляют собой модификацию нуклеотида, следующего за мотивом "Y₁Y₂", которая отличается от модификации Y, и при этом N_a и N_b могут представлять собой одинаковые или разные модификации. В качестве альтернативы N_a и/или N_b могут присутствовать или отсутствовать в том случае, если присутствует фланкирующая модификация.

RNAi-средство может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Фосфотиоатная или метилфосфонатная модификация межнуклеотидной связи может встречаться у любого нуклеотида смысловой нити или антисмысловой нити или обеих нитей в любом положении нити. Например, модификация межнуклеотидной связи может встречаться у каждого нуклеотида в смысловой нити и/или антисмысловой нити; при этом каждая модификация межнуклеотидной связи может встречаться в виде чередующегося паттерна в смысловой нити и/или антисмысловой нити; или смысловая нить или антисмысловая нить могут содержать обе модификации межнуклеотидной связи в виде чередующегося паттерна. Чередующийся паттерн модификаций межнуклеотидной связи в смысловой нити может быть таким же, как у антисмысловой нити, или отличным от него, и чередующийся паттерн модификаций межнуклеотидной связи в смысловой нити может иметь сдвиг относительно чередующегося паттерна модификаций межнуклеотидной связи в антисмысловой нити. В одном варианте осуществления двухнитевое RNAi-средство содержит 6-8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей. В одном варианте осуществления антисмысловая нить содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, а смысловая нить содержит по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи либо на 5'-конце, либо на 3'-конце.

В одном варианте осуществления RNAi-средство имеет фосфотиоатную или метилфосфонатную модификацию межнуклеотидной связи в участке выступающего конца. Например, участок выступающего конца может содержать два нуклеотида с фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью между этими двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также могут быть выполнены для присоединения нуклеотидов выступающего конца к концевым спаренным нуклеотидам в пределах дуплексного участка. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все нуклеотиды выступающего конца могут быть связаны посредством фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи и необязательно могут присутствовать дополнительные фосфотиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, соединяющие нуклеотид выступающего конца со спаренным нуклеотидом, который следует за нуклеотидом выступающего конца. Например, между тремя концевыми нуклеотидами могут присутствовать по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов представляют собой нуклеотиды выступающего конца, а третий представляет собой спаренный

нуклеотид, следующий за нуклеотидом выступающего конца. Эти три концевые нуклеотида могут находиться на 3'-конце антисмысловой нити, 3'-конце смысловой нити, 5'-конце антисмысловой нити и/или 5'-конце антисмысловой нити.

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

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

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

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

В другом варианте осуществления нуклеотид на 3'-конце смысловой нити представляет собой дезокситимин (dT). В другом варианте осуществления нуклеотид на 3'-конце антисмысловой нити представляет собой дезокситимин (dT). В одном варианте осуществления на 3'-конце смысловой и/или антисмысловой цепи присутствует короткая последовательность из дезокситиминовых нуклеотидов, например, два dT нуклеотида.

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



где каждый из i и j независимо равняется 0 или 1;

каждый из p и q независимо равняется 0-6;

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

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

каждый n_p и n_q независимо представляет собой нуклеотид выступающего конца;

где N_b и Y имеют неодинаковую модификацию; и

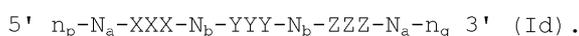
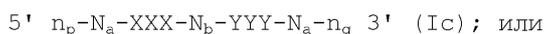
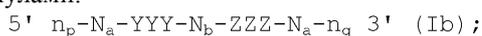
каждый из XXX, YYY и ZZZ независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах. Предпочтительно все нуклеотиды YYY представляют собой 2'-F-модифицированные нуклеотиды.

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

В одном варианте осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой нити или рядом с ним. Например, когда RNAi-средство содержит дуплексный участок, длина которого составляет 17-23 нуклеотида, мотив YYY может находиться в сайте расщепления или рядом с ним (например, может находиться в положениях 6, 7, 8; 7, 8, 9; 8, 9, 10; 9, 10, 11; 10, 11, 12 или 11, 12, 13) смысловой нити, при этом отсчет начинается с 1^{го} нуклеотида от 5'-конца; или необязательно отсчет начинается с 1^{го} спаренного нуклеотида от 5'-конца в пределах дуплексного участка.

В одном варианте осуществления i равняется 1, а j равняется 0, или i равняется 0, а j равняется 1,

или как i , так и j равняются 1. Таким образом, смысловая нить может быть представлена следующими формулами:



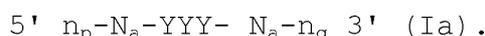
Когда смысловая нить представлена формулой (Ib), N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных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

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

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

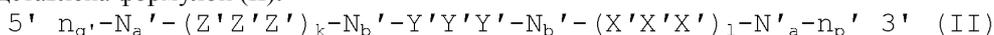
Каждый из X, Y и Z может быть одинаковым или отличным от остальных.

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



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

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



где каждый из k и l независимо равняется 0 или 1;

каждый из p' и q' независимо равняется 0-6;

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

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

каждый n_p' и n_q' независимо представляют собой нуклеотид выступающего конца;

где N_b' и Y' имеют неодинаковую модификацию;

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

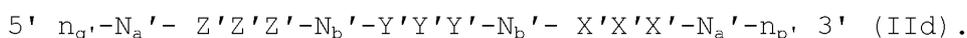
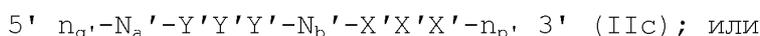
В одном варианте осуществления N_a' и/или N_b' содержит модификации в виде чередующегося паттерна.

Мотив $Y'Y'Y'$ встречается в сайте расщепления антисмысловой нити или рядом с ним. Например, когда RNAi-средство содержит дуплексный участок, длина которого составляет 17-23 нуклеотида, мотив $Y'Y'Y'$ может находиться в положениях 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14 или 13, 14, 15 антисмысловой нити, при этом отсчет начинается с 1^{10} нуклеотида от 5'-конца; или необязательно отсчет начинается с 1^{10} спаренного нуклеотида от 5'-конца в пределах дуплексного участка. Предпочтительно мотив $Y'Y'Y'$ находится в положениях 11, 12, 13.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды мотива $Y'Y'Y'$ представляют собой 2'-ОМемодифицированные нуклеотиды.

В одном варианте осуществления k равняется 1, а l равняется 0, или k равняется 0, а l равняется 1, или как k , так и l равняются 1.

Таким образом, антисмысловая нить может быть представлена следующими формулами:

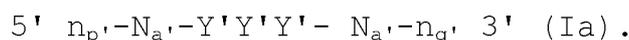


Когда антисмысловая нить представлена формулой (IIb), N_b' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15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

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

Когда антисмысловая нить представлена формулой (Id), каждый N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно N_b' состоит из 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов.

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



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

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

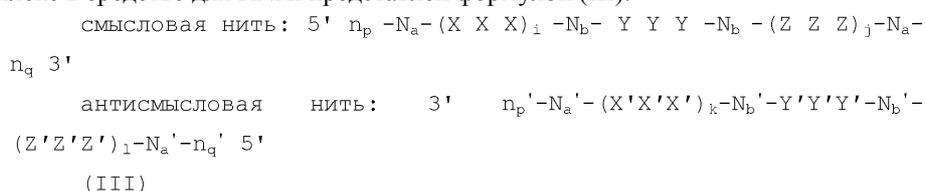
Каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити независимо может быть модифицирован с помощью LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-метила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-гидроксила или 2'-фтора. Например, каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью 2'-О-метила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

В одном варианте осуществления смысловая нить RNAi-средства может содержать мотив YYY, встречающийся в положениях 9, 10 и 11 нити, когда дуплексный участок состоит из 21 нуклеотида, при этом отсчет начинается с 1^{го} нуклеотида от 5'-конца, или необязательно отсчет начинается с 1^{го} спаренного нуклеотида от 5'-конца в пределах дуплексного участка; а Y' представляет собой 2'-F-модификацию. Смысловая нить может дополнительно содержать мотив XXX или мотивы ZZZ в качестве фланкирующих модификаций на противоположных концах дуплексного участка; и каждый из XXX и ZZZ независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

В одном варианте осуществления антисмысловая нить может содержать мотив Y'Y'Y', встречающийся в положениях 11, 12, 13 нити, при этом отсчет начинается с 1^{го} нуклеотида от 5'-конца, или необязательно отсчет начинается с 1^{го} спаренного нуклеотида от 5'-конца в пределах дуплексного участка; а Y' представляет собой 2'-О-метил-модификацию. Антисмысловая нить может дополнительно содержать мотив X'X'X' или мотивы Z'Z'Z' в качестве фланкирующих модификаций на противоположных концах дуплексного участка; и каждый из X'X'X' и Z'Z'Z' независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

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

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



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

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

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

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

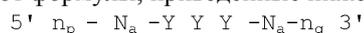
где каждый n_p' , n_p , n_q' и n_q , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой нуклеотид выступающего конца; и

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

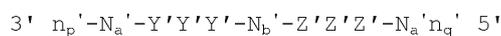
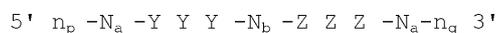
В одном варианте осуществления i равняется 0, а j равняется 0; или i равняется 1, а j равняется 0; или i равняется 0, а j равняется 1; или как i , так и j равняются 0; или как i , так и j равняются 1. В другом варианте осуществления k равняется 0, а l равняется 0; или k равняется 1, а l равняется 0; k равняется 0, а

l равняется 1; или как k, так и l равняется 0; или так k, так и l равняются 1.

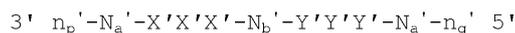
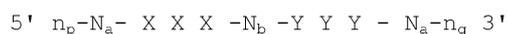
Иллюстративные комбинации смысловой нити и антисмысловой нити, образующих дуплекс в средстве для RNAi, включают формулы, приведенные ниже:



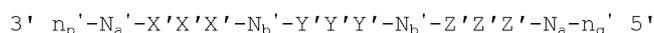
(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



(IIId)

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

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

Когда RNAi-средство представлено формулой (IIIc), каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда RNAi-средство представлено формулой (IIId), каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a , N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждый из N_a , N_a' , N_b и N_b' независимо содержит модификации в виде чередующегося паттерна.

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

Когда RNAi-средство представлено формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), по меньшей мере один из нуклеотидов Y может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Y'. В качестве альтернативы по меньшей мере два из нуклеотидов Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'; или все три из нуклеотидов Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'.

Когда RNAi-средство представлено формулой (IIIb) или (IIId), по меньшей мере один из нуклеотидов Z может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Z'. В качестве альтернативы по меньшей мере два из нуклеотидов Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z'; или все три из нуклеотидов Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z'.

Когда RNAi-средство представлено формулой (IIIc) или (IIId), по меньшей мере один из нуклеотидов X может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов X'. В качестве альтернативы по меньшей мере два из нуклеотидов X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X'; или все три из нуклеотидов X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X'.

В одном варианте осуществления модификация нуклеотида Y отличается от модификации нуклеотида Y', модификация нуклеотида Z отличается от модификации нуклеотида Z', и/или модификация нуклеотида X отличается от модификации нуклеотида X'.

В одном варианте осуществления, когда RNAi-средство представлено формулой (IIId), модификации N_a представляют собой

2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации. В другом варианте осуществления, когда RNAi-средство представлено формулой (IIId), модификации N_a представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, и $\text{n}_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи. В еще одном варианте осуществления, когда RNAi-средство представлено формулой (IIId), модификации N_a представляют собой 2'-О-метил-или 2'-фтор-модификации, $\text{n}_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, а смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера (описанного ниже). В другом варианте осуществ-

вления, когда RNAi-средство представлено формулой (III_d), модификации N_a представляют собой 2'-О-метил-или 2'-фтор-модификации, n_p' >0, и по меньшей мере один n_p' соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь, и смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления, когда RNAi-средство представлено формулой (III_a), модификации N_a представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, n_p' >0, и по меньшей мере один n_p' соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь, и смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления RNAi-средство является мультимером, содержащим по меньшей мере два дуплекса, представленных формулой (III), (III_a), (III_b), (III_c) и (III_d), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген или на два различных гена; или каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В одном варианте осуществления RNAi-средство является мультимером, содержащим три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулой (III), (III_a), (III_b), (III_c) и (III_d), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген или на два различных гена; или каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В одном варианте осуществления два RNAi-средства, представленные формулой (III), (III_a), (III_b), (III_c) и (III_d), соединены друг с другом на 5'-конце, и один или оба 3'-конца необязательно конъюгированы с лигандом. Каждое из средств может нацеливаться на один и тот же ген или на два различных гена; или каждое из средств может нацеливаться на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

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

Как описано более подробно ниже, в случае RNAi-средства, содержащего один или нескольких углеводных фрагментов, конъюгированных со RNAi-средством, может улучшаться одно или несколько свойств RNAi-средства. Во многих случаях углеводный фрагмент будет присоединен к модифицированной субъединице RNAi-средства. Например, рибозный сахар одной или нескольких рибонуклеотидных субъединиц средства на основе dsRNA можно заменять на другой фрагмент, например, отличный от углевода (предпочтительно циклический) носитель, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидную субъединицу, в которой рибозный сахар субъединицы был заменен таким образом, обозначают в данном документе как субъединицу с модификацией путем замены рибозы (RRMS). Циклический носитель может представлять собой карбоциклическую кольцевую системой, т.е. все атомы в кольце являются атомами углерода, или гетероциклическую кольцевую систему, т.е. один или несколько атомов в кольце могут быть гетероатомом, например, азотом, кислородом, серой. Циклический носитель может представлять собой моноциклическую кольцевую систему или может содержать два или более колец, например, конденсированных колец. Циклический носитель может представлять собой полностью насыщенную кольцевую систему или может содержать одну или несколько двойных связей.

Лиганд может быть присоединен к полинуклеотиду посредством носителя. Носители включают (i) по меньшей мере одну "точку присоединения к остову", предпочтительно две "точки присоединения к остову" и (ii) по меньшей мере одну "связывающую точку присоединения". "Точка присоединения к остову", используемая в данном документе, обозначает функциональную группу, например, гидроксильную группу, или, как правило, связь, доступную и подходящую для встраивания носителя в остов, например, фосфатный или модифицированный фосфатный, например, серосодержащий, остов рибонуклеиновой кислоты. "Связывающая точка присоединения" (TAP) в некоторых вариантах осуществления обозначает входящий в состав кольца атом циклического носителя, например, атом углерода или гетероатом (отличный от атома, который обеспечивает точку присоединения к остову), с которым связывается выбранный фрагмент. Фрагмент может быть например, углеводом, например, моносахаридом, дисахаридом, трисахаридом, тетрасахаридом, олигосахаридом и полисахаридом. Необязательно выбранный фрагмент присоединен к циклическому носителю посредством промежуточного связывающего фрагмента. Таким образом, циклический носитель зачастую будет включать функциональную группу, например, аминогруппу, или, как правило, обеспечивать связь, подходящую для введения другого химического структурного элемента, например, лиганда, в состав кольца или связывания его с кольцом.

RNAi-средства можно конъюгировать с лигандом через носитель, где носитель может быть циклической группой или ациклической группой; при этом предпочтительно циклическая группа выбрана из

пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина; предпочтительно ациклическая группа выбрана из сериолового остова или диэтаноламинного остова.

В определенных конкретных вариантах осуществления RNAi-средство для применения в способах по настоящему изобретению представляет собой средство, выбранное из группы средств, приведенных в любой из таблиц 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21 и 23. Такие средства могут дополнительно содержать лиганд.

IV. iRNA, конъюгированные с лигандами.

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

В одном варианте осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или время существования средства на основе iRNA, в которое он встроен. В предпочтительных вариантах осуществления лиганд обеспечивает повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, например, молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, например, клеточного компартмента или части органа, ткани, органа или участка тела, как, например, по сравнению с молекулами, у которых отсутствует такой лиганд. Предпочтительные лиганды не будут принимать участие в спаривании дуплекса в дуплексной нуклеиновой кислоте.

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

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

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (ТРРС4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О-(гексадецил)глицерин, геранилоксигексилную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептаде-

цильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеоил)литохолевую кислоту, ОЗ-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин и пептидные конъюгаты (например, пептид antennapedia, Tat-пептид), алкилирующие средства, фосфат, амино, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченные радиоизотопами маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), вещества, способствующие транспорту/абсорбции (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, конъюгаты акридин-имидазол, комплексы тетраазамакроциклов с Eu³⁺), динитрофенил, HRP или AP.

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

Лигандом может быть вещество, например, лекарственное средство, которое может увеличивать проникновение средства на основе iRNA в клетку, например, путем разрушения цитоскелета клетки, например, путем разрушения микротрубочек, микрофиламентов и/или промежуточных филаментов клетки. Лекарственным средством может быть, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокадазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

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

Конъюгированные с лигандами олигонуклеотиды по настоящему изобретению можно синтезировать с применением олигонуклеотида, который несет боковую реакционноспособную функциональную группу, такого как полученный в результате присоединения связывающей молекулы к олигонуклеотиду (описано ниже). Этот реакционноспособный олигонуклеотид может напрямую вступать в реакцию с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезированы как несущие любую из разнообразных защитных групп, или лигандами, которые имеют связывающий фрагмент, присоединенный к ним.

Олигонуклеотиды, применяемые в конъюгатах по настоящему изобретению, можно получать с помощью удобной и стандартной методики хорошо известного твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза реализуется несколькими фирмами-производителями, включая, например, Applied Biosystems (Фостер Сити, Калифорния). В качестве дополнения или альтернативы можно использовать любые другие средства для такого синтеза, известные из уровня техники. Также известно применение аналогичных методик для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфотиоаты и алкилированные производные.

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

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

А. Липидные конъюгаты.

В одном варианте осуществления лиганд или конъюгат представляет собой липидную молекулу или молекулу на основе липида. Такая липидная молекула или молекула на основе липида предпочтительно связывается с сывороточным белком, например, сывороточным альбумином человека (HSA). Связывающийся с HSA лиганд делает возможным распределение конъюгата в целевой ткани, например, в отличной от ткани почек целевой ткани организма. Например, целевой тканью может быть печень, в том числе паренхиматозные клетки печени. Также в качестве лигандов можно применять другие молекулы, которые могут связываться с HSA. Например, можно применять напроксен или аспирин. Липидный лиганд или лиганд на основе липида может (а) повышать устойчивость конъюгата к разрушению, (б) улучшать нацеливание или транспорт в целевую клетку или клеточную мембрану, и/или (с) может применяться для корректировки связывания с сывороточным белком например, HSA.

Лиганд на основе липида можно применять для ингибирования, например, для контроля связывания конъюгата с целевой тканью. Например, липидный лиганд или лиганд на основе липида, который более сильно связывается с HSA, с меньшей вероятностью будет нацеливаться на почки и, следовательно, с меньшей вероятностью будет выводиться из организма. Липидный лиганд или лиганд на основе липида, который менее прочно связывается с HSA, можно применять для нацеливания конъюгата на почки.

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

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

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

В. Средства, обеспечивающие проникновение в клетку.

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

Лигандом может быть пептид или пептидомиметик.

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

Пептид или пептидомиметик может представлять собой, например, пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий, главным образом, из Tug, Tgr или Phe). Пептидный фрагмент может представлять собой пептид-дендример, конформационно затрудненный пептид или перекрестно сшитый пептид. В другом альтернативном варианте пептидный фрагмент может включать гидрофобную последовательность, обеспечивающую перенос через мембрану (MTS). Иллюстративным пептидом, содержащим гидрофобную MTS, является RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 3). Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 4), содержащий гидрофобную MTS, также может являться нацеливающим фрагментом. Пептидный фрагмент может представлять собой "доставляющий" пептид, который может переносить большие полярные молекулы, в том числе пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны. Например, было обнаружено, что последовательности из Tat-белка HIV (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 5) и белка Antennapedia Drosophila (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 6) способны функционировать в качестве доставляющих пептидов. Пептид или пептидомиметик могут быть закодированы в случайной последова-

тельности ДНК, как, например, пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея или комбинаторной библиотеки "одна гранула-одно соединение" (OBOC) (Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991). Примерами пептида или пептидомиметика, связанного со средством на основе dsRNA посредством введенной мономерной структурной единицы в рамках нацеливания на клетку, является пептид, состоящий из аргинина-глицина-аспарагиновой кислоты (RGD), или RGD-миметик. Длина пептидного фрагмента может варьироваться от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут иметь структурную модификацию, как, например, для повышения стабильности или управления конформационными свойствами. Можно использовать любую из структурных модификаций, описанных ниже.

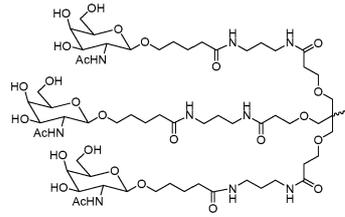
RGD-пептид для применения в композициях и способах по настоящему изобретению может быть линейным или циклическим, и может быть модифицированным, например, гликозилированным или метилированным, для облегчения нацеливания на конкретную ткань(и). Пептиды и пептидомиметики, содержащие RGD, могут включать D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD можно применять другие фрагменты, которые нацеливаются на лиганд интегрина. Предпочтительные конъюгаты с таким лигандом нацеливаются на PECAM-1 или VEGF.

"Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку" способен проникать в клетку, например, микробную клетку, такую как клетка бактерии или гриба, или в клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Пептид, проникающий в микробную клетку, может представлять собой, например, α -спиральный линейный пептид (например, LL-37 или цекаропин P1), пептид, содержащий дисульфидную связь (например, α -дефензин, β -дефензин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две преобладающие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, также может включать сигнал ядерной локализации (NLS). Например, пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, может представлять собой двухкомпонентный амфипатический пептид, такой как MPG, который получен из домена слитого пептида gp41 HIV-1 и NLS из большого Т-антигена SV40 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

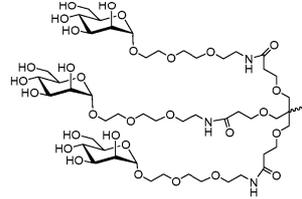
С. Углеводные конъюгаты.

В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению олигонуклеотид iRNA, дополнительно содержит углевод. iRNA, конъюгированная с углеводом, предпочтительна для *in vivo* доставки нуклеиновых кислот, а также композиций, подходящих для *in vivo* терапевтического применения, как описано в данном документе. Используемый в данном документе "углевод" обозначает соединение, которое либо представляет собой углевод *per se*, образованный из одной или нескольких моносахаридных структурных единиц, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (которые могут образовывать линейную, разветвленную или циклическую структуру) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода; либо соединение, частью которого является углеводный фрагмент, образованный из одной или нескольких моносахаридных структурных единиц, каждая из которых имеет по меньшей мере шесть атомов углерода (которые могут образовывать линейную, разветвленную или циклическую структуру) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Типичные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие приблизительно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных структурных единиц) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные камеди. Конкретные моносахариды включают сахара C5 и более (например, C5, C6, C7 или C8); ди- и трисахариды включают сахара с двумя или тремя моносахаридными структурными единицами (например, C5, C6, C7 или C8).

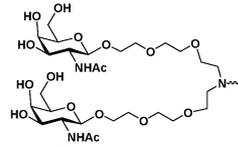
В одном варианте осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах по настоящему изобретению представляет собой моносахарид. В другом варианте осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах по настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из



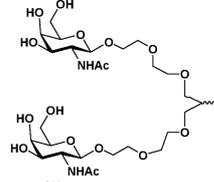
Формула II,



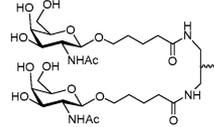
Формула III,



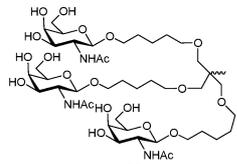
Формула IV,



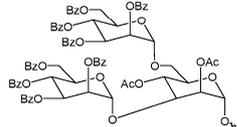
Формула V,



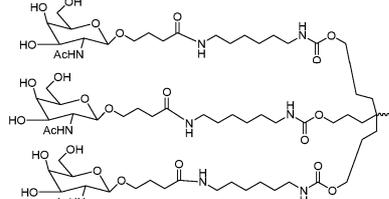
Формула VI,



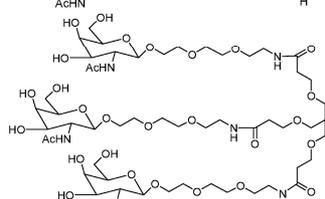
Формула VII,



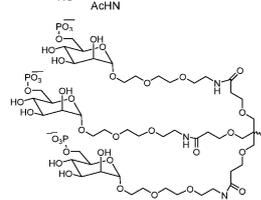
Формула VIII,



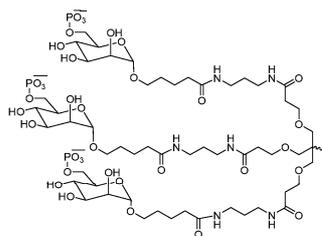
Формула IX,



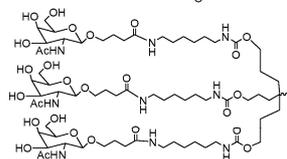
Формула X,



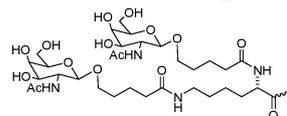
Формула XI,



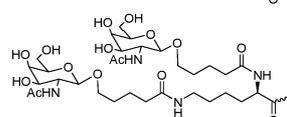
Формула XII,



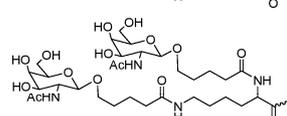
Формула XIII,



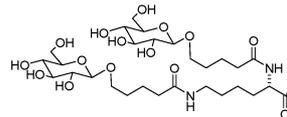
Формула XIV,



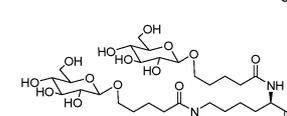
Формула XV,



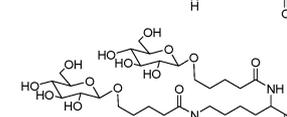
Формула XVI,



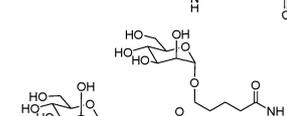
Формула XVII,



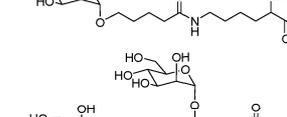
Формула XVIII,



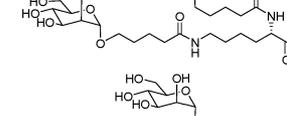
Формула XIX,



Формула XX,

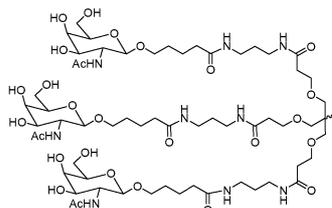


Формула XXI,



Формула XXII.

В одном варианте осуществления моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин, такой как



Формула II.

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

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

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

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

Линкер может включать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется под действием конкретного фермента. Тип расщепляемой линкерной группы, включенной в линкер, может зависеть от клетки, подлежащей нацеливанию. Например, лиганд, нацеливающий на печень, может быть связан с катионным липидом через линкер, который включает сложноэфирную группу. Клетки печени характеризуются высоким содержанием эстераз и, следовательно, линкер будет расщепляться более эффективно в клетках печени, а не в типах клеток, для которых не характерно высокое содержание эстераз. Другие типы клеток с высоким содержанием эстераз включают клетки легкого, коркового вещества почки и яйца.

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

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

i. Линкерные группы, расщепляемые с помощью окислительно-восстановительных реакций.

В одном варианте осуществления расщепляемая линкерная группа представляет собой расщепляемую с помощью окислительно-восстановительных реакций связывающую группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером расщепляемой при восстановлении линкерной группы является дисульфидная линкерная группа (-S-S-). Для определения того, подходит ли кандидатная расщепляемая линкерная группа в качестве "расщепляемой при восстановлении линкерной группой" или, например, подходит ли для применения с конкретным фрагментом iRNA и конкретным нацеливающим средством, можно обратиться к способам, описанным в данном документе. Например, кандидатное соединение можно оценивать путем инкубации с дитиотреитолом (DTT) или другим восстанавливающим средством с применением реагентов, известных из уровня техники, которые имитируют скорость расще-

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

ii. Фосфатные расщепляемые линкерные группы.

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер предусматривает фосфатную расщепляемую линкерную группу. Фосфатная расщепляемая линкерная группа расщепляется под действием средств, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Примером средства, которое расщепляет фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как фосфатазы клетки. Примерами фосфатных линкерных групп являются -O-P(O)(ORk)-O-, O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-. Предпочтительными вариантами осуществления являются -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, -O-P(S)(H)-S-.

Предпочтительный вариант осуществления представляет собой -O-P(O)(OH)-O-. Эти кандидатные соединения можно оценивать с помощью способов, аналогичных описанным выше.

iii. Расщепляемые кислотой линкерные группы.

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер предусматривает расщепляемую кислотой линкерную группу. Расщепляемая кислотой линкерная группа представляет собой линкерную группу, которая расщепляется в кислых условиях. В предпочтительных вариантах осуществления расщепляемые кислотой линкерные группы расщепляются в кислой среде с pH, составляющим приблизительно 6,5 или менее (например, приблизительно 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0 или менее), или под действием средств, таких как ферменты, которые могут действовать как универсальная кислота. В клетке специфические органеллы, характеризующиеся низким pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечить расщепляющую среду для расщепляемых кислотами линкерных групп. Примеры расщепляемых кислотами линкерных групп включают без ограничения гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Расщепляемые кислотами группы могут характеризоваться общей формулой -C=NN-, C(O)O или -OC(O). Предпочтительным вариантом осуществления является случай, когда атом углерода, присоединенный к кислороду сложноэфирной группы (в алкоксигруппе), входит в состав арильной группы, замещенной алкильной группы или четвертичной алкильной группы, такой как диметилпентил или трет-бутил. Эти кандидатные соединения можно оценивать с помощью способов, аналогичных описанным выше.

iv. Сложноэфирные линкерные группы.

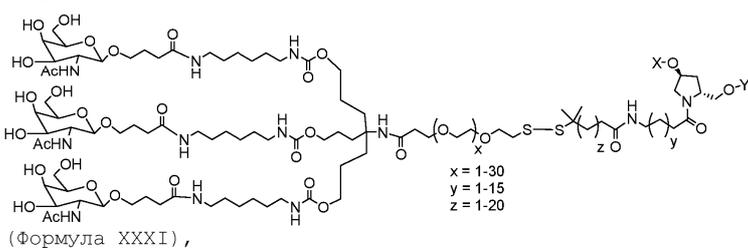
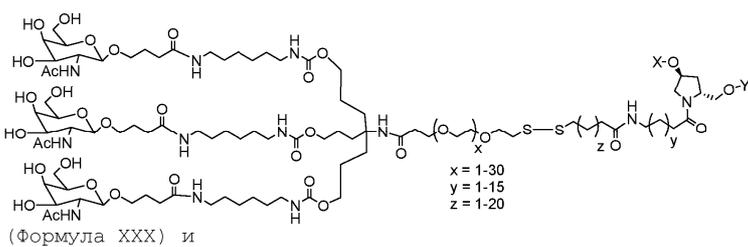
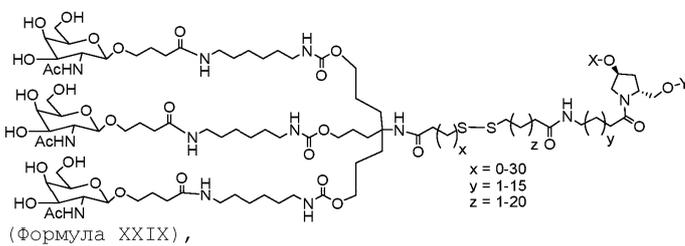
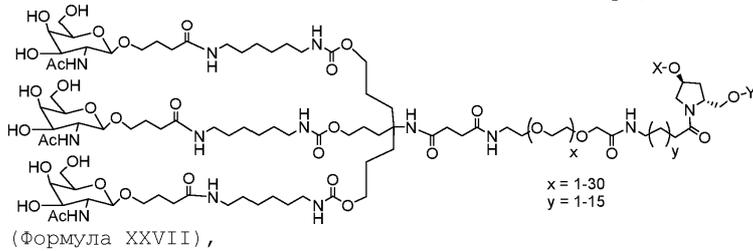
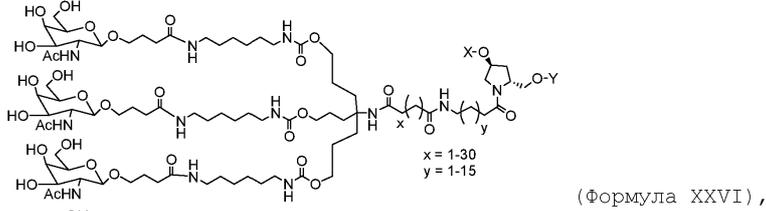
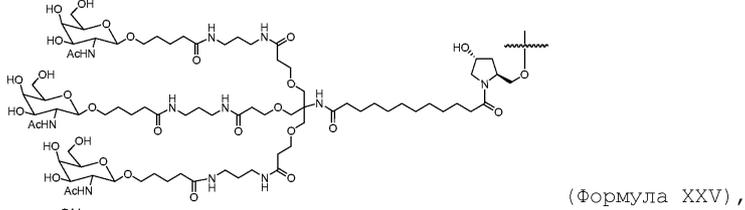
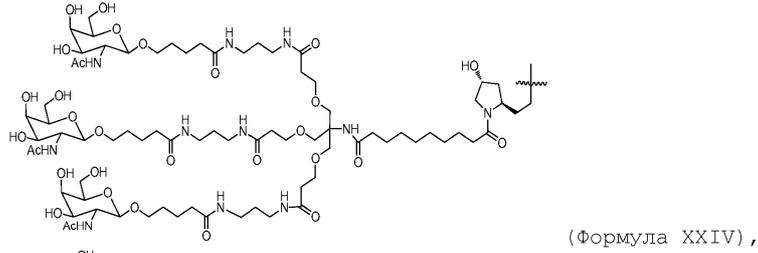
В другом варианте осуществления расщепляемый линкер предусматривает сложноэфирную линкерную группу. Сложноэфирная расщепляемая линкерная группа расщепляется в клетках под действием ферментов, таких как эстеразы и амидазы. Примеры сложноэфирных расщепляемых линкерных групп включают без ограничения сложные эфиры с алкиленовыми, алкениленовыми и алкиниленовыми группами. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой -C(O)O- или -OC(O)-. Эти кандидатные соединения можно оценивать с помощью способов, аналогичных описанным выше.

v. Пептидные расщепляемые группы.

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

В одном варианте осуществления iRNA по настоящему изобретению конъюгирована с углеводом через линкер. Неограничивающие примеры углеводных конъюгатов iRNA с линкерами в композициях и

способах по настоящему изобретению включают без ограничения

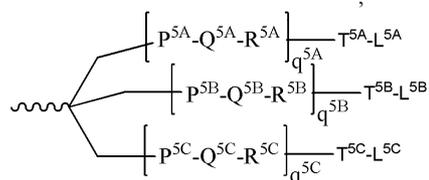
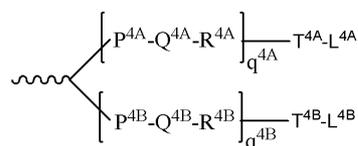
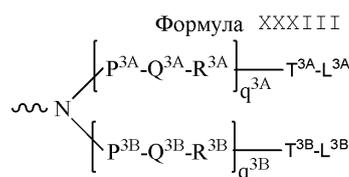
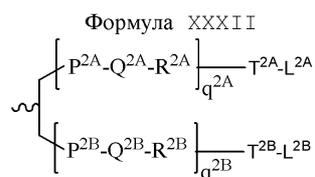


где один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, при этом другой представляет собой водород.

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

В одном варианте осуществления dsRNA по настоящему изобретению конъюгирована с двухва-

лентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, показанных в любой из формул (XXXII)-(XXXV):

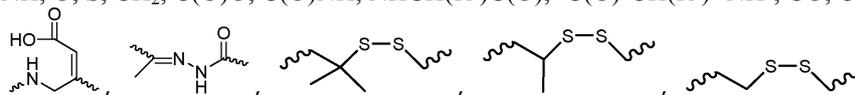


где q^{2A} , q^{2B} , q^{3A} , q^{3B} , q^{4A} , q^{4B} , q^{5A} , q^{5B} и q^{5C} независимо в каждом случае равняются 0-20, и где повторяющиеся структурные единицы могут быть одинаковыми или различными;

каждый из P^{2A} , P^{2B} , P^{3A} , P^{3B} , P^{4A} , P^{4B} , P^{5A} , P^{5B} , P^{5C} , T^{2A} , T^{2B} , T^{3A} , T^{3B} , T^{4A} , T^{4B} , T^{5A} , T^{5B} , T^{5C} независимо в каждом случае отсутствует, представляет собой CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH или CH₂O;

Q^{2A} , Q^{2B} , Q^{3A} , Q^{3B} , Q^{4A} , Q^{4B} , Q^{5A} , Q^{5B} , Q^{5C} независимо в каждом случае отсутствуют, представляют собой алкилен, замещенный алкилен, где один или несколько метиленов могут прерываться или оканчиваться одним или несколькими из O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C=C или C(O);

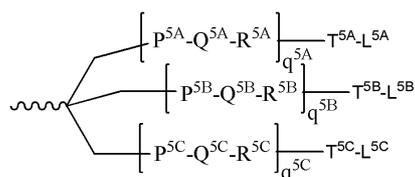
каждый из R^{2A} , R^{2B} , R^{3A} , R^{3B} , R^{4A} , R^{4B} , R^{5A} , R^{5B} , R^{5C} независимо в каждом случае отсутствует, представляет собой NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-O,



или гетероциклил;

L^{2A} , L^{2B} , L^{3A} , L^{3B} , L^{4A} , L^{4B} , L^{5A} , L^{5B} и L^{5C} представляют собой лиганд; т.е. каждый из них независимо в каждом случае представляет собой моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и R^a представляет собой H или боковую цепь аминокислоты. Трехвалентные линкеры, конъюгирующие производные GalNAc, особенно пригодны для применения со RNAi-средствами для ингибирования экспрессии гена-мишени, такие как характеризующиеся формулой (XXXVI):

Формула XXXVI



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

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

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

Не является необходимым, чтобы все положения в данном соединении были модифицированы единообразно, и, фактически, более чем одна из вышеупомянутых модификаций может быть включена в одно соединение или даже в один нуклеозид в пределах iRNA. Настоящее изобретение также включает

соединения на основе iRNA, которые представляют собой химерные соединения.

"Химерные" соединения на основе iRNA или "химеры" в контексте настоящего изобретения представляют собой соединения на основе iRNA, предпочтительно dsRNA, которые содержат два или более химически отличающихся участка, каждый из которых состоит по меньшей мере из одной мономерной структурной единицы, т. е. нуклеотида в случае соединения на основе dsRNA. Такие iRNA, как правило, содержат по меньшей мере один участок, где РНК модифицирована таким образом, чтобы обеспечить iRNA повышенную устойчивость к разрушению нуклеазами, повышенное поглощение клеткой и/или повышенную аффинность связывания в отношении целевой нуклеиновой кислоты. Дополнительный участок iRNA может служить в качестве субстрата для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. В качестве примера, РНКазы H представляют собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет нить РНК в дуплексе РНК:ДНК. Активация РНКазы H, следовательно, приводит к расщеплению РНК-мишени, вследствие чего значительно повышается эффективность ингибирования экспрессии гена с помощью iRNA. Следовательно, зачастую, если применять химерные dsRNA, сравнимые результаты можно получить с более короткими iRNA по сравнению с фосфотиоатными дезокси-dsRNA, гибридизирующимися с тем же целевым участком. Расщепление РНК-мишени традиционно можно обнаруживать с помощью гель-электрофореза и при необходимости с помощью ассоциированных методик гибридизации нуклеиновых кислот, известных из уровня техники.

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

IV. Доставка iRNA по настоящему изобретению.

Доставку iRNA по настоящему изобретению в клетку, например клетку в организме субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект, у которого имеется нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9), можно осуществлять с помощью целого ряда различных путей. Например, доставку можно осуществлять путем приведения клетки в контакт с iRNA по настоящему изобретению либо *in vitro*, либо *in vivo*. *In vivo* доставку также можно осуществлять напрямую путем введения субъекту композиции, содержащей iRNA, например dsRNA. В качестве альтернативы *in vivo* доставку можно осуществлять опосредованно путем введения одного или нескольких векторов, которые кодируют iRNA и управляют ее экспрессией. Такие альтернативные случаи дополнительно обсуждаются ниже.

В целом, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) может быть адаптирован для применения с iRNA по настоящему изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 и WO94/02595, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Что касается *in vivo* доставки, факторы, которые учитывают в контексте доставки молекулы iRNA, включают, например, биологическую стабильность доставляемой молекулы, предотвращение неспецифических эффектов и накопление доставляемой молекулы в целевой ткани. Неспецифические эффекты iRNA могут быть сведены к минимуму путем локального введения, например путем прямой инъекции или вживления в ткань, или местного применения препарата. Локальное введение в участок, подлежащий лечению, максимально увеличивает локальную концентрацию средства, ограничивает воздействие средства на системные ткани, которые в ином случае могут быть повреждены средством или которые могут разрушить средство, и позволяет вводить более низкую общую дозу молекулы iRNA. С помощью нескольких исследований был показан эффективное обусловленное нокадауном паде-

ние уровней продуктов генов при локальном введении iRNA. Например, было показано, что внутриглазная доставка dsRNA к VEGF как путем интравитреальной инъекции яванским макакам (Tolentino, MJ., et al (2004) *Retina* 24:132-138), так и путем субретинальных инъекций мышам (Reich, SJ., et al (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) предупреждает неоваскуляризацию в экспериментальной модели возрастной макулярной дистрофии. Кроме того, прямая внутриопухолевая инъекция dsRNA мышам снижает объем опухолей (Pille, J., et al (2005) *Mol. Ther.* 11:267-274) и может увеличивать время жизни мышей, несущих опухоль (Kim, WJ., et al (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350; Li, S., et al (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523). Было показано, что РНК-интерференция была также успешной при локальной доставке в ЦНС путем прямой инъекции (Dorn, G., et al. (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH., et al (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H., et al (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., et al (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., et al (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya, Y., et al (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602) и в легкие путем интраназального введения (Howard, KA., et al (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X., et al (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Bitko, V., et al (2005) *Nat. Med.* 11:50-55). В случае системного введения iRNA для лечения заболевания РНК может быть модифицирована или, в качестве альтернативы, доставлена с помощью системы доставки лекарственного средства; при этом оба способа предотвращают быстрое разрушение dsRNA под действием эндо- и экзонуклеаз *in vivo*. Модификация РНК или фармацевтический носитель также могут обеспечивать нацеливание композиции на основе iRNA на целевую ткань, и с их помощью можно избежать нежелательных нецелевых эффектов. Молекулы iRNA можно модифицировать с помощью химической конъюгации с липофильными группами, такими как холестерин, для повышения поглощения клеткой и предотвращения разрушения. Например, iRNA, направленную против AroB, которая конъюгирована с липофильным фрагментом, представляющим собой холестерин, вводили системно мышам и это приводило к нокдауну мРНК aroB как в печени, так и в тонкой кишке (Soutschek, J., et al (2004) *Nature* 432:173-178). Как было показано, конъюгация iRNA с аптамером ингибирует рост опухоли и опосредует регресс опухоли на мышинной модели рака предстательной железы (McNamara, JO., et al (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). В альтернативном варианте осуществления iRNA можно доставлять с помощью систем доставки лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки способствуют связыванию молекулы iRNA (отрицательно заряженной), а также усиливают взаимодействия на отрицательно заряженной клеточной мембране с обеспечением эффективного поглощения iRNA клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры можно либо связывать с iRNA, либо их индуцируют для образования везикулы или мицеллы (см., например, Kim SH., et al (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), которые заключают в себе iRNA. Образование везикул или мицелл дополнительно предотвращает разрушение iRNA при системном введении. Способы получения и введения комплексов катионный липид-iRNA находятся в пределах квалификации специалиста в данной области (см., например, Sorensen, DR., et al (2003) *J. Mol. Biol.* 327:761-766; Verma, UN., et al (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS et al (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственных средств, применимых для системной доставки iRNA, включают DOTAP (Sorensen, DR., et al (2003), выше; Verma, UN., et al (2003), выше), олигофектамин, "твердые частицы с нуклеиновой кислотой-липидом" (Zimmermann, TS., et al (2006) *Nature* 441:111-114), кардиолипин (Chien, PY., et al (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A., et al (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), полиэтиленмин (Bonnet ME., et al (2008) *Pharm. Res.* электронная публикация перед подачей в печать 16 августа; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), пептиды, содержащие Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487) и полиамидамины (Tomalia, DA., et al (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., et al (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). В некоторых вариантах осуществления iRNA образует комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции на основе iRNA и циклодекстринов можно найти в патенте США № 7427605, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

А. Кодированные вектором iRNA по настоящему изобретению iRNA, нацеливающиеся на ген PCSK9, могут экспрессироваться за счет единиц транскрипции, вставленных в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture, A, et al., *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., международную публикацию согласно РСТ № WO 00/22113, Conrad, международную публикацию согласно РСТ № WO 00/22114 и Conrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть временной (порядка нескольких часов - недель) или длительной (недели - месяцы или дольше) в зависимости от конкретной применяемой конструкции и целевой ткани или типа клеток. Такие трансгены можно вводить в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может представлять собой интегрирующий или неинтегрирующий вектор. Трансген также можно конструировать с возможностью его наследования в виде экстрахромосомной плазмиды (Gassmann, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

Отдельные нити или нити iRNA могут транскрибироваться с промотора в векторе экспрессии. Если следует экспрессировать две отдельные нити для получения, например, dsRNA, в целевую клетку можно совместно вводить два отдельных вектора экспрессии (например, путем трансфекции или инфицирования). В качестве альтернативы каждая отдельная нить dsRNA может транскрибироваться за счет промо-

торов, оба из которых расположены в одной и той же плазмиде экспрессии. В одном варианте осуществления dsRNA экспрессируется в виде полинуклеотидов с инвертированным повтором, соединенных линкерной полинуклеотидной последовательностью так, что dsRNA имеет структуру типа "стебель-петля".

Векторы экспрессии iRNA, как правило, представляют собой ДНК-плазмиды или вирусные векторы. Чтобы получать рекомбинантные конструкции для экспрессии iRNA, как описано в данном документе, можно применять векторы экспрессии, совместимые с эукариотическими клетками, предпочтительно совместимые с клетками позвоночных. Векторы для экспрессии в эукариотических клетках хорошо известны из уровня техники и доступны из ряда коммерческих источников. Как правило, предусматривается, что такие векторы содержат подходящие сайты рестрикции для вставки требуемого сегмента нуклеиновой кислоты. Доставка векторов, экспрессирующих iRNA, может быть системной, как, например, путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в целевые клетки, эксплантированные из пациента, с последующим обратным введением пациенту или с помощью любого другого способа, который обеспечивает возможность введения в требуемую целевую клетку.

Плазмиды экспрессии iRNA можно трансфицировать в целевые клетки в виде комплекса с носителями на основе катионного липида (например, олигофектамина) или носителями на основе некаатионного липида (например, Transit-ТКО™). В настоящем изобретении также предусмотрены множественные трансфекции с помощью липидов для iRNA-опосредованных нокдаунов, нацеливающихся на различные участки целевой РНК, на протяжении недели или более. Успешное введение векторов в клетки-хозяева можно контролировать с применением разнообразных известных способов. Например, временную трансфекцию можно выявить с помощью репортера, такого как флуоресцентный маркер, например, зеленый флуоресцентный белок (GFP). Стабильная трансфекция клеток *ex vivo* может быть подтверждена с применением маркеров, которые придают трансфицированной клетке устойчивость к определенным факторам окружения (например, антибиотикам и лекарственным средствам), такую как устойчивость к гигромицину В.

Системы на основе вирусных векторов, которые можно использовать со способами и композициями, описанными в данном документе, включают без ограничения (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, в том числе без ограничения лентивирусные векторы, вирус мышинного лейкоза Молони и т.д.; (c) векторы на основе аденоассоциированного вируса; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (e) векторы на основе SV40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) векторы на основе пикорнавируса; (i) векторы на основе поксвируса, такого как ортопокс, например, векторы на основе вируса осповакцины, или авипоксвирус, например, поксвируса канареек или вируса оспы кур; и (j) хелпер-зависимый или "слабый" аденовирус. Также преимущественными могут быть вирусы, дефектные по репликации. Различные векторы будут встраиваться в геном клеток или не будут встраиваться в геном клеток. При необходимости конструкции могут включать последовательности вирусов для трансфекции. В качестве альтернативы конструкция может быть встроена в векторы, способные к эписомальной репликации, например, векторы на основе EPV и EBV. Для обеспечения экспрессии iRNA в целевых клетках в конструкции для рекомбинантной экспрессии iRNA, как правило, будут предусматриваться регуляторные элементы, например, промоторы, энхансеры и т.д. Другие аспекты, учитываемые в отношении векторов и конструкций, дополнительно описаны ниже.

Векторы, применимые для доставки iRNA, будут включать регуляторные элементы (промотор, энхансер и т. д.), подходящие для экспрессии iRNA в требуемой целевой клетке или ткани. Могут быть выбраны регуляторные элементы для обеспечения либо конститутивной, либо регулируемой/индуцируемой экспрессии.

Экспрессию iRNA можно точно регулировать, например, путем использования индуцируемой регуляторной последовательности, которая чувствительна к определенным физиологическим регуляторам, например, уровням циркулирующей глюкозы или гормонам (Docherty et al., 1994, FASEB J. 8:20-24). Такие индуцируемые системы экспрессии, которые подходят для управления экспрессией dsRNA в клетках или у млекопитающих, включают, например, регуляцию с помощью экдизона, с помощью эстрогена, прогестерона, тетрациклина, химических индукторов димеризации и изопропил-бета-D1-тиогактопиранозида (IPTG). Специалист в данной области сможет выбрать соответствующую регуляторную/промоторную последовательность, опираясь на планируемое применение трансгена iRNA.

Можно применять вирусные векторы, которые содержат последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие iRNA. Например, можно применять ретровирусный вектор (см. Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)). Эти ретровирусные векторы содержат компоненты, необходимые для правильной упаковки вирусного генома и интеграции в ДНК клетки-хозяина. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие iRNA, клонируют в один или несколько векторов, которые облегчают доставку нуклеиновой кислоты в пациента. Более подробную информацию о ретровирусных векторах можно найти, например, в Boesen et al., Biotherapy 6:291-302 (1994), где описано применение ретровирусного вектора для доставки гена *mdr1* в гемопоэтические стволовые клетки, чтобы сделать стволовые клетки более устойчивыми к химиотерапии. Другими источниками, иллюстрирующими применение ретровирусных векторов в генной терапии, являются Clowes et al., J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); и Grossman and Wil-

son, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114 (1993). Лентивирусные векторы, предусматриваемые для применения, включают, например, векторы на основе HIV (ВИЧ), описанные в патентах США №№ 6143520; 5665557 и 5981276, которые включены в данный документ посредством ссылки.

Аденовирусы также предусматриваются для применения в доставке iRNA по настоящему изобретению. Аденовирусы представляют собой особенно перспективные носители, например, для доставки генов в эпителий респираторного тракта. Аденовирусы естественным образом инфицируют эпителий респираторного тракта, где они вызывают заболевание с легким течением. Другими мишенями для систем доставки на основе аденовирусов являются печень, центральная нервная система, эндотелиальные клетки и мышцы. Преимущество аденовирусов состоит в том, что они способны инфицировать неделящиеся клетки. В Kozarsky и Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) представлена обзорная статья о генной терапии на основе аденовирусов. В Bout et al., *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) продемонстрировано применение аденовирусных векторов для переноса генов в эпителий респираторного тракта макаков-резусов. Дополнительные примеры применения аденовирусов в генной терапии можно найти в Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993); публикации согласно PCT WO94/12649 и Wang, et al., *Gene Therapy* 2:775-783 (1995). Подходящий AV-вектор для экспрессии iRNA, представленной в настоящем изобретении, способ конструирования рекомбинантного AV-вектора и способ доставки вектора в целевые клетки описаны в Xia H et al. (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010.

Векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) также можно применять для доставки iRNA по настоящему изобретению (Walsh et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 (1993); патент США № 5436146). В одном варианте осуществления iRNA может экспрессироваться в виде двух отдельных комплементарных одностранных молекул РНК за счет рекомбинантного AAV-вектора, имеющего, например, или промотор U6 или H1 РНК, или промотор цитомегаловируса (CMV). Подходящие AAV-векторы для экспрессии dsRNA, представленной в настоящем изобретении, способы конструирования рекомбинантного AV-вектора и способы доставки векторов в целевые клетки описаны в Samulski R et al. (1987), *J. Virol.* 61: 3096-3101; Fisher K J et al. (1996), *J. Virol.* 70: 520-532; Samulski R et al. (1989), *J. Virol.* 63: 3822-3826; патенте США № 5252479; патент США № 5139941; международной заявке на патент № WO 94/13788 и международной заявке на патент № WO 93/24641, полное раскрытие которых включено в данный документ посредством ссылки.

Другой вирусный вектор, подходящий для доставки iRNA по настоящему изобретению, представляет собой поксвирус, такой как вирус осповакцины, например, аттенуированный вирус осповакцины, как, например, модифицированный вирус Анкара (MVA) или NYVAC, авипоксвирус, как, например, вирус оспы кур или оспы канареек.

В соответствующих случаях тропизм вирусных векторов может быть модифицирован путем псевдотипирования векторов с помощью белков оболочки или других поверхностных антигенов других вирусов или путем замещения различных белков вирусного капсида. Например, лентивирусные векторы можно подвергать псевдотипированию с помощью поверхностных белков вируса везикулярного стоматита (VSV), вируса бешенства, вируса Эбола, вируса Мокола и т. п. Можно получать AAV-векторы, которые нацеливаются на различные клетки, путем конструирования векторов таким образом, чтобы они экспрессировали различные серотипы капсидных белков; см., например, Rabinowitz J E et al. (2002), *J. Virol* 76:791-801, полное раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки.

Фармацевтический препарат на основе вектора может включать вектор в приемлемом разбавителе или может включать матрицу для замедленного высвобождения, в которую заключено средство для доставки генов. В качестве альтернативы, если полноценный вектор для доставки гена может продуцироваться интактным в рекомбинантных клетках, например, ретровирусные векторы, то фармацевтический препарат может включать одну или несколько клеток, которые продуцируют систему доставки генов.

V. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают iRNA по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие iRNA, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

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

Фраза "фармацевтически приемлемый носитель", используемая в данном документе, означает фармацевтически приемлемые материал, композицию или среду, как, например, жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, наполнитель, добавку для производства (например, смазывающее вещество, тальк, стеарат магния, кальция или цинка или стеариновую кислоту) или материал для инкапсулирования растворителя, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения от одного органа или части тела к другому органу или части тела. Каждый носитель должен быть "приемлемым" в том

смысле, что он должен быть совместимым с другими ингредиентами состава и не наносить вред субъекту, подлежащему лечению. Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) виды крахмала, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетилцеллюлоза; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) смазывающие средства, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк; (8) наполнители, такие как масло какао и суппозиторные воски; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апирогенную воду; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) буферные растворы с определенным pH; (21) сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; (22) объемобразующие средства, такие как полипептиды и аминокислоты; (23) компонент сыворотки крови, такой как сывороточный альбумин, HDL и LDL; и (22) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

Фармацевтические композиции, содержащие iRNA, применимы для лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией или активностью PCSK9, например, заболевания или нарушения, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии PCSK9. Такие фармацевтические композиции составляют в зависимости от способа доставки. Одним примером являются композиции, которые составлены для системного введения посредством доставки парентеральным путем, например, путем подкожной (SC), внутримышечной (IM) или внутривенной (IV) доставки. Другим примером являются композиции, которые составлены для непосредственной доставки в паренхиму головного мозга, например, путем инфузии в головной мозг, такой как непрерывная инфузия с помощью насоса. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в дозировках, достаточных для ингибирования экспрессии гена PCSK9.

Предпочтительно, в способах по настоящему изобретению средство на основе iRNA вводят субъекту в виде фиксированной дозы. В одном конкретном варианте осуществления фиксированная доза средства на основе iRNA по настоящему изобретению основана на предварительно определенном весе или возрасте.

В некоторых вариантах осуществления RNAi-средство вводят в виде фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 850 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 400 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 300 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 750 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 850 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 750 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 850 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 750 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 850 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 750 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 550 мг или от приблизительно 400 мг до приблизительно 500 мг.

В некоторых вариантах осуществления RNAi-средство вводят в виде фиксированной дозы, составляющей приблизительно приблизительно 100 мг, приблизительно 125 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 175 мг, 200 мг, приблизительно 225 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 275 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 325 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 375 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 425 мг, приблизительно 450 мг, приблизительно 475 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 525 мг, приблизительно 550 мг, приблизительно 575 мг, приблизительно 600 мг, приблизительно 625 мг, приблизительно 650 мг, приблизительно 675 мг, приблизительно 700 мг, приблизительно 725 мг, приблизительно 750 мг, приблизительно 775 мг, приблизительно 800 мг, приблизительно 825 мг или приблизительно 850 мг.

В некоторых вариантах осуществления субъектам вводят, например подкожно или внутримышечно, несколько доз с терапевтическим количеством iRNA.

iRNA можно составлять в виде фармацевтической композиции при подходящей концентрации так,

чтобы вводить субъекту подходящий объем композиции, такой как приблизительно 1,0 мл, 1,1 мл, 1,2 мл, 1,3 мл, 1,4 мл, 1,5 мл, 1,6 мл, 1,7 мл, 1,8 мл, 1,9 мл или приблизительно 2,0 мл фармацевтической композиции. Например, в одном варианте осуществления средство на основе iRNA по настоящему изобретению составлено в виде подходящего фармацевтического состава из расчета приблизительно 200 мг/мл, так что введение субъекту приблизительно 1,5 мл состава обеспечит фиксированную дозу средства, составляющую 300 мг.

Как описано в данном документе, однократная доза средств на основе iRNA или фармацевтических композиций, содержащих такие средства, может предусматривать длительное действие, так что последующие дозы вводят с интервалами не более чем 1 неделя, 2 недели, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев или 6 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления субъектам вводят, например подкожно или внутримышечно, повторную дозу с терапевтическим количеством iRNA. Схема с повторной дозой может включать введение терапевтического количества iRNA на регулярной основе, как например, один раз в месяц, один раз в два месяца, один раз в квартал, один раз в четыре месяца, один раз в пять месяцев или два раза в год. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения однократную дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят один раз в квартал (qQ). В других вариантах осуществления настоящего изобретения однократную дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят два раза в год (т. е. раз в шесть месяцев). Введение можно повторять, например, один раз в квартал в течение 6 месяцев, одного года, двух лет или дольше, например, вводить постоянно.

В некоторых вариантах осуществления RNAi-средство вводят согласно схеме дозирования, которая включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания.

Фаза насыщения может включать однократное введение RNAi-средства в течение первой недели, однократное введение RNAi-средства в течение первых двух недель или однократное введение RNAi-средства в течение первого месяца в виде фиксированной дозы, составляющей, например, от приблизительно 100 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 250 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 350 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 450 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 500 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 550 мг до приблизительно 700 мг, от приблизительно 600 до приблизительно 700 мг, от приблизительно 650 до приблизительно 700 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 250 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 350 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 450 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 500 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 550 мг до приблизительно 650 мг, от приблизительно 600 до приблизительно 650 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 250 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 350 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 450 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 500 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 550 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 250 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 350 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 450 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 500 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 250 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 350 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 400 мг до приблизительно 500 мг или от приблизительно 450 мг до приблизительно 500 мг, например, в виде фиксированной дозы, составляющей приблизительно 100 мг, приблизительно 125 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 175 мг, 200 мг, приблизительно 225 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 275 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 325 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 375 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 425 мг, приблизительно 450 мг, приблизительно 475 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 525 мг, приблизительно 550 мг, приблизительно 575 мг, приблизительно 600 мг, приблизительно 625 мг, приблизительно 650 мг, приблизительно 675 мг или приблизительно 700 мг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к вышеизложенным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Фаза поддержания может включать введение субъекту дозы RNAi-средства один раз в месяц, один раз в два месяца, один раз в три месяца, один раз в четыре месяца, один раз в пять месяцев или один раз в шесть месяцев. В одном конкретном варианте осуществления поддерживающую дозу вводят субъекту один раз в месяц.

Поддерживающая доза или дозы могут быть такими же или более низкими, чем начальная доза, например, составлять половину начальной дозы. Например, поддерживающая доза, которую вводят субъекту ежемесячно, может составлять от приблизительно 25 мг до приблизительно 100 мг, например, от приблизительно 25 мг до приблизительно 75 мг, от приблизительно 25 мг до приблизительно 50 мг или от приблизительно 50 мг до приблизительно 75 мг, например, приблизительно 25 мг, приблизительно 30 мг, приблизительно 35 мг, приблизительно 40 мг, приблизительно 45 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 55 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 65 мг, приблизительно 70 мг, приблизительно 75 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 85 мг, приблизительно 90 мг, приблизительно 95 мг или приблизительно 100 мг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к вышеизложенным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Фармацевтическую композицию можно вводить путем внутривенной инфузии в течение некоторого периода времени, например, в течение 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и 21, 22, 23, 24 или приблизительно 25-минутного периода. Введение можно повторять, например, на регулярной основе, как например, один раз в неделю, один раз в две недели (т. е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше. По завершению начальной схемы лечения средства лечения можно вводить на менее частой основе. Например, после введения один раз в неделю или один раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц в течение шести месяцев или года или дольше.

Специалисту в данной области будет понятно, что определенные факторы могут влиять на дозировку и временные рамки, необходимые для эффективного лечения субъекта, в том числе без ограничения тяжесть заболевания или нарушения, виды предшествующего лечения, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания. Кроме того, лечение субъекта с помощью терапевтически эффективного количества композиции может включать один период лечения или серию периодов лечения. Расчеты эффективных дозировок и *in vivo* периодов полужизни для индивидуальных iRNA, охваченных настоящим изобретением, можно проводить с применением традиционных методологий или на основе *in vivo* тестирования с применением соответствующей животной модели, как описано в другом месте данного документа.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить различными путями в зависимости от того, требуется ли локальное или системное лечение, и от области, подлежащей обработке. Введение может быть местным (например, с помощью трансдермального пластыря), легочным, например, путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе с помощью ингалятора; интратрахеальным, интраназальным, эпидермальным и трансдермальным, пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; субдермальное, например, посредством имплантированного устройства; или интракраниальное, например, интрапаренхиматозное, интратекальное или интравентрикулярное введение.

iRNA можно доставлять таким образом, чтобы происходило нацеливание на конкретную ткань, такую как печень (например, гепатоциты печени).

Фармацевтические композиции и составы для местного введения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, распыляемые растворы, жидкости и порошки. Могут быть необходимы или желательны традиционные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и т. п. Также могут быть применимы презервативы, перчатки с покрытием и т. п. Подходящие составы для местного введения включают составы, в которых iRNA, представленные в настоящем изобретении, находятся в смеси со средством для местной доставки, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие средства и поверхностно-активные вещества. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеилфосфатидилэтаноламин DOPE, димиристоилфосфатидилхолин DMPC, дистеароилфосфатидилхолин), отрицательно заряженные (например, димиристоилфосфатидилглицерин DMPG) и катионные (например, диолеилтетраметиламинопропил DOTAP и диолеилфосфатидилэтаноламин DOTMA). iRNA, представленные в настоящем изобретении, могут быть инкапсулированы в липосомах или могут образовывать комплексы с ними, в частности, с катионными липосомами. В качестве альтернативы iRNA могут образовывать комплексы с липидами, в частности с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают без ограничения арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту, эйкозановую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или сложные C₁₋₂₀жирные эфиры (например, изопропилмири- стат (IPM)), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль. Составы для местного введения подробно описаны в патенте США № 6747014, который включен в данный документ посредством ссылки.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводных средах, капсулы, желатиновые капсулы, па-

кетки-саше, таблетки или минитаблетки. Могут потребоваться загустители, ароматизирующие вещества, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие средства или связующие вещества. В некоторых вариантах осуществления составы для перорального введения являются такими, в которых dsRNA, представленные в настоящем изобретении, вводят в сочетании с одним или несколькими веществами, способствующими проникновению, поверхностно-активными веществами и хелаторами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты и/или их сложные эфиры или соли, желчные кислоты и/или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли желчных кислот включают хенодесоксихолевую кислоту (CDCA) и урсодесоксихенодесоксиколевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюкохолевую кислоту, гликохолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, тауродезоксиколевую кислоту, тауро-24,25-дигидрофузидат натрия и гликодигидрофузидат натрия. Подходящие жирные кислоты включают арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилаза-циклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую). В некоторых вариантах осуществления используют комбинации веществ, способствующих проникновению, например, жирные кислоты/соли жирных кислот в комбинации с желчными кислотами/солями желчных кислот. Одной иллюстративной комбинацией является натриевая соль лауриновой кислоты, каприновая кислота и UDCA. Дополнительные вещества, способствующие проникновению, включают простой полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, простой полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир. Представленные в настоящем изобретении dsRNA могут доставляться перорально, в форме гранул, в том числе высушенных распылением частиц, или в составе комплексов для образования микро- или наночастиц. Комплексообразующие средства для dsRNA включают полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксетаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные виды желатина, альбумины, виды крахмала, акрилаты, полиэтиленгликоли (PEG) и виды крахмала; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-производные полиимины, поллуланы, виды целлюлозы и виды крахмала. Подходящие комплексообразующие средства включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилипиридин, политиодиэтиламинотиметилен (PTDAE), полиаминостирол (например, p-амино), поли(метицианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D,L-молочную кислоту), сополимер DL-молочной и гликолевой кислот (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG). Составы на основе dsRNA для перорального введения и их получение подробно описаны в патенте США № 6887906, в публикации заявки на патент США № 20030027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интрапаренхиматозного (в головной мозг), интракального, интравентрикулярного или внутривенного введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки, такие как без ограничения вещества, способствующие проникновению, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или наполнители.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают без ограничения растворы, эмульсии и содержащие липосомы составы. Такие композиции могут быть получены из различных компонентов, которые включают без ограничения предварительно полученные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. При лечении заболеваний печени, таких как гепатокарцинома, особенно предпочтительными являются составы, которые нацеливаются на печень.

Фармацевтические составы по настоящему изобретению, которые в целях удобства могут находиться в виде единичной лекарственной формы, можно получать согласно традиционным методикам, хорошо известным в фармацевтической промышленности. Такие методики включают стадию объединения активных ингредиентов с фармацевтическим носителем(ями) или наполнителем(ями). Обычно составы получают путем равномерного и тщательного объединения активных ингредиентов с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями или обоими, а затем при необходимости придания продукту формы.

Композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в виде любой из множества возможных лекарственных форм, таких как без ограничения таблетки, капсулы, желатиновые капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели, суппозитории и клизмы. Композиции по настоящему изобретению также могут быть составлены в виде суспензий в водных, неводных или смешанных средах. Водные суспензии дополнительно могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, в том числе, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

А. Дополнительные составы.

i. Эмульсии.

Композиции по настоящему изобретению могут быть получены и составлены в виде эмульсий. Эмульсии, как правило, представляют собой гетерогенные системы из одной жидкости, диспергированной в другой в форме капелек, диаметр которых обычно превышает 0,1 мкм (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al. в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Эмульсии зачастую представляют собой двухфазные системы, содержащие две несмешивающиеся жидкие фазы, тщательно перемешанные и диспергированные одна в другой. Как правило, эмульсии могут быть эмульсиями по типу либо "вода в масле" (w/o), либо "масло в воде" (o/w). Когда водная фаза измельчена и диспергированной в виде мельчайших капелек в общем объеме масляной фазы, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "вода в масле" (w/o). В качестве альтернативы, когда масляная фаза измельчена и диспергирована в виде мельчайших капелек в общем объеме водной фазы, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "масло в воде" (o/w). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты помимо диспергированных фаз и активного лекарственного средства, которое может присутствовать либо в виде раствора в водной фазе, масляной фазе, либо само по себе в качестве отдельной фазы. Фармацевтические наполнители, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты, также могут присутствовать в эмульсиях при необходимости. Фармацевтические эмульсии также могут представлять собой множественные эмульсии, которые состоят из более чем двух фаз, как, например, в случае эмульсий по типу "масло-в-воде-в-масле" (o/w/o) и "вода-в-масле-в-воде" (w/o/w). Такие сложные составы часто обеспечивают определенные преимущества, которые не обеспечивают простые двухкомпонентные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные масляные капельки эмульсии по типу o/w заключают маленькие водные капельки, составляют эмульсию по типу w/o/w. Аналогично этому система масляных капелек, заключенная в каплях воды, стабилизированных в масляной диспергирующей фазе, дает эмульсию по типу o/w/o.

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

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

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

Встречающиеся в природе эмульгаторы, применяемые в эмульсионных составах, включают ланолин, пчелиный воск, фосфатиды, лецитин и гуммиарабик. Абсорбционные основы, такие как безводный ланолин и гидрофильный вазелин, обладают гидрофильными свойствами, так что они могут впитывать воду с образованием эмульсий по типу w/o, сохраняя при этом свою полутвердую консистенцию. Тонкоизмельченные твердые вещества также применялись в качестве подходящих эмульгаторов, в особенности в комбинации с поверхностно-активными веществами и в вязких препаратах. Они включают полярные неорганические твердые вещества, такие как гидроксиды тяжелых металлов, ненабухающие глины,

такие как бентонит, аттапульгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный силикат алюминия и коллоидный алюмосиликат магния, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как углерод или тристеарат глицерина.

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

Гидрофильные коллоиды или гидроколлоиды включают встречающиеся в природе смолы и синтетические полимеры, такие как полисахариды (например, гуммиарабик, агар, альгиновую кислоту, каррагенан, гуаровую камедь, камедь карайи и трагакант), производные целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлозу и карбоксипропилцеллюлозу) и синтетические полимеры (например, карбомеры, простые эфиры целлюлозы и карбоксивиниловые полимеры). Они диспергируются или набухают в воде с образованием коллоидных растворов, которые стабилизируют эмульсии путем образования прочных межфазных пленок вокруг капелек диспергированной фазы и путем повышения вязкости дисперсионной фазы.

Поскольку эмульсии зачастую содержат целый ряд ингредиентов, таких как углеводы, белки, стеролы и фосфатиды, которые благоприятны для поддержания роста микроорганизмов, то такие составы часто включают консерванты. Общеупотребительные консерванты, включаемые в эмульсионные составы, включают метилпарабен, пропилпарабен, соли четвертичного аммония, хлорид бензалкония, сложные эфиры *p*-гидроксibenзойной кислоты и борную кислоту. Для предупреждения ухудшения качества состава в эмульсионные составы также обычно добавляют антиоксиданты. Применяемые антиоксиданты могут представлять собой акцепторы свободных радикалов, такие как токоферолы, алкилгаллаты, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, или восстановители, такие как аскорбиновая кислота и метабисульфит натрия, и синергисты антиоксидантов, такие как лимонная кислота, винная кислота и лецитин.

Применение эмульсионных составов посредством дерматологического, перорального и парентерального путей введения и способы их получения были рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Эмульсионные составы для пероральной доставки применялись очень широко из-за удобства составления, а также с точки зрения эффективности абсорбции и биодоступности (см., например, Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Слабительные средства на основе минеральных масел, жирорастворимые витамины и питательные препараты с высоким содержанием жиров входят в число материалов, которые обычно вводятся перорально в виде эмульсий по типу *o/w*.

ii. Микроэмульсии.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиции на основе iRNA и нуклеиновых кислот составлены в виде микроэмульсий. Можно дать определение микроэмульсии как системе из воды, масла и амфифильного вещества, которая представляет собой единый оптически изотропный и термодинамически стабильный жидкий раствор (см., например, Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Обычно микроэмульсии представляют собой системы, которые получают вначале путем диспергирования масла в водном растворе поверхностно-активного вещества, а затем добавления достаточного количества четвертого компонента, как правило, спирта со средней длиной цепи для образования прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также были описаны как термодинамически стабильные, изотропно прозрачные дисперсии двух несмешиваемых жидкостей, которые стабилизируются пленками из межфазными пленками из поверхностно-активных молекул (Leung and Shah, в *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215). Микроэмульсии обычно получают путем объединения от трех до пяти компонентов, которые включают масло, воду, поверхностно-активное вещество, вторичное поверхностно-активное вещество и электролит. Является ли микроэмульсия эмульсией по типу "вода в масле" (*w/o*) или по типу "масло в воде" (*o/w*), зависит от свойств используемого масла и поверхностно-активного вещества и от структуры и геометрической упаковки полярных головок и углеводородных хвостов молекул поверхностно-активного вещества (Schott, в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

Активно изучался феноменологический подход с использованием фазовых диаграмм, и с его помощью специалистами в данной области были получены обширные данные о том, как составлять микро-

эмульсии (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC, 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). Преимущество микроэмульсий по сравнению с традиционными эмульсиями состоит в солюбилизации не растворимых в воде лекарственных средств в составе из термодинамически стабильных капелек, которые образуются самопроизвольно.

Поверхностно-активные вещества, используемые в получении микроэмульсий, включают без ограничения ионогенные поверхностно-активные вещества, неионогенные поверхностно-активные вещества, Brij 96, простые полиоксиэтиленолеиловые эфиры, сложные эфиры жирных кислот и полиглицерина, тетраглицерина монолаурат (ML310), тетраглицерина моноолеат (MO310), гексаглицерина моноолеат (PO310), гексаглицерина пентаолеат (PO500), декаглицерина монокапрат (MCA750), декаглицерина моноолеат (MO750), декаглицерина секвиолеат (SO750), декаглицерина декаолеат (DAO750) отдельно или в комбинации с вторичными поверхностно-активными веществами. Вторичное поверхностно-активное вещество, обычно являющееся спиртом с короткой цепью, таким как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит для увеличения межфазной текучести путем внедрения в пленку из поверхностно-активного вещества и соответственно создания неупорядоченной пленки из-за пустого пространства, образующегося между молекулами поверхностно-активного вещества. При этом микроэмульсии могут быть получены без применения вторичных поверхностно-активных веществ, и из уровня техники известны самоэмульгирующиеся микроэмульсионные системы без спирта. Водной фазой, как правило, без ограничения может быть вода, водный раствор лекарственного средства, глицерин, PEG300, PEG400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляная фаза может включать без ограничения такие материалы, как Carptex 300, Carptex 355, Carpmul MCM, сложные эфиры жирных кислот, среднецепочечные (C₈-C₁₂) моно-, ди- и триглицериды, сложные полиоксиэтилированные эфиры жирных кислот и глицерина, жирные спирты, полигликолизированные глицериды, насыщенные полигликолизированные C₈-C₁₀глицериды, растительные масла и силиконовое масло.

Микроэмульсии представляют особый интерес с точки зрения солюбилизации лекарственного средства и повышенной абсорбции лекарственных средств. Липидные микроэмульсии (как по типу o/w, так и по типу w/o) были предложены для увеличения пероральной биодоступности лекарственных средств, включая пептиды (см., например, патенты США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). Микроэмульсии обеспечивают преимущества в виде улучшенной солюбилизации лекарственного средства, защиты лекарственного средства от ферментативного гидролиза, возможного повышения абсорбции лекарственного средства за счет индуцированных поверхностно-активным веществом изменений текучести и проницаемости мембран, удобства получения, удобства перорального введения по сравнению с твердыми лекарственными формами, улучшенной клинической эффективности и сниженной токсичности (см., например, патенты США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143). Зачастую микроэмульсии могут формироваться самопроизвольно, когда их компоненты объединяют при температуре окружающей среды. Это может иметь особенное преимущество, когда составляют термолабильные лекарственные средства, пептиды или iRNA. Микроэмульсии также были эффективными в трансдермальной доставке активных компонентов при применениях как в косметологии, так и в фармации. Предполагается, что композиции и составы микроэмульсий по настоящему изобретению будут способствовать повышенной системной абсорбции iRNA и нуклеиновых кислот из желудочно-кишечного тракта, а также улучшать локальное поглощение iRNA и нуклеиновых кислот клетками.

Микроэмульсии по настоящему изобретению также могут содержать дополнительные компоненты и добавки, такие как сорбитанмоностеарат (Grill 3), Labrasol и вещества, способствующие проникновению, для улучшения свойств состава и для повышения абсорбции iRNA и нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Вещества, способствующие проникновению, применяемые в микроэмульсиях по настоящему изобретению, можно классифицировать как принадлежащие к одной из пяти основных категорий: поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие средства и нехелатирующие вещества, не являющиеся поверхностно-активными (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92). Каждый из этих классов обсуждается выше.

iii. Микрочастицы.

RNAi-средство по настоящему изобретению может быть включено в состав частицы, например, микрочастицы. Микрочастицы можно получать при помощи высушивания распылением, но также можно получать другими способами, в том числе лиофилизацией, выпариванием, сушкой в псевдооживленном слое, сушкой в вакууме или при помощи комбинации этих методик.

iv. Вещества, способствующие проникновению.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения разнообразные вещества, способствующие проникновению, используют для осуществления эффективной доставки нуклеиновых кислот, в частности iRNA, в кожу животных. Большинство лекарственных средств присутствуют в растворе как в

ионизированной, так и в неионизированной формах. Однако обычно только жирорастворимые или липофильные лекарственные средства легко проходят через клеточные мембраны. Было установлено, что даже нелипофильные лекарственные средства могут проходить через клеточные мембраны, если мембрана, через которую необходимо пройти, обработана веществом, способствующим проникновению. В дополнение к содействию диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны вещества, способствующие проникновению, также повышают проницаемость для липофильных лекарственных средств.

Вещества, способствующие проникновению, можно классифицировать как принадлежащие к одной из пяти основных категорий, т. е. поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие средства и нехелатирующие вещества, не являющиеся поверхностно-активными (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Каждый из вышеуказанных классов веществ, способствующих проникновению, описан более подробно ниже.

Поверхностно-активные вещества (или "сурфактанты") являются химическими частицами, которые при растворении в водном растворе снижают поверхностное натяжение раствора или межфазное натяжение между водным раствором и другой жидкостью, в результате чего повышается абсорбция iRNA через слизистую оболочку. В дополнение к солям желчных кислот и жирным кислотам, эти вещества, способствующие проникновению, включают, например, лаурилсульфат натрия, полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир и полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92) и перфторированные эмульсии, такие как FC-43. Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

Разнообразные жирные кислоты и их производные, которые действуют в качестве веществ, способствующих проникновению, включают, например, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприновую кислоту (н-декановую кислоту), миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеил-рац-глицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, их сложные C₁₋₂₀алкиловые эфиры (например, метиловый, изопропиловый и трет-бутиловый) и их моно- и диглицериды (т. е. олеат, лаурат, капрат, мирилат, пальмитат, стеарат, линолеат и т. д.) (см., например, Touitou, E., et al. *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

Физиологическая роль желчи включает облегчение диспергирования и абсорбции липидов и жирорастворимых витаминов (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 в *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). Различные природные соли желчных кислот и их синтетические производные выступают в роли веществ, способствующих проникновению. Таким образом, термин "соли желчных кислот" включает любые из встречающихся в природе компонентов желчи, а также любые из их синтетических производных. Подходящие соли желчных кислот включают, например, холевую кислоту (или ее фармацевтически приемлемую натриевую соль, холат натрия), дегидрохолевую кислоту (дегидрохолат натрия), дезоксихолевую кислоту (дезоксихолат натрия), глюкохолевую кислоту (глюкохолат натрия), гликохолевую кислоту (гликохолат натрия), гликодезоксихолевую кислоту (гликодезоксихолат натрия), таурохолевую кислоту (таурохолат натрия), тауродезоксихолевую кислоту (тауродезоксихолат натрия), хенодезоксихолевую кислоту (хенодезоксихолат натрия), урсодезоксихолевую кислоту (UDCA), тауро-24,25-дигидрофузидат натрия (STDHF), гликодигидрофузидат натрия и полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир (POE) (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita et al., *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583).

Можно дать определение хелатирующим средствам, используемым вместе с настоящим изобретением, как соединениям, которые удаляют ионы металла из раствора путем образования комплексов с ними, в результате чего повышается абсорбция iRNA через слизистую оболочку. Что касается их применения в качестве веществ, способствующих проникновению, в настоящем изобретении, хелатирующие средства обладают дополнительным преимуществом в том, что они также служат ингибиторами ДНКаз, поскольку большинство охарактеризованных ДНК-нуклеаз требуют двухвалентный ион металла для катализа и, таким образом, ингибируются хелатирующими средствами (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Подходящие хелатирующие средства включают без ограничения этилендиаминтетраацетат динатрия (EDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат, 5-метоксисалицилат и гомовалинат натрия), N-ацилпроизводные коллагена, лаурет-9- и N-аминоацильные производные бета-

дикетонов (енамины) (см., например, Katdare, A. et al., *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

Можно дать определение применяемым в данном документе нехелатирующим соединениям, способствующим проникновению, которые не являются поверхностно-активными, как соединения, которые демонстрируют незначительную активность в качестве хелатирующих средств или в качестве поверхностно-активных веществ, но которые, тем не менее, усиливают абсорбцию iRNA через слизистую оболочку пищеварительного тракта (см., например, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Этот класс веществ, способствующих проникновению, включает, например, ненасыщенные циклические соединения мочевины, производные 1-алкил- и 1-алкенилазациклоалкана (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92) и нестероидные противовоспалительные средства, такие как диклофенак натрия, индометацин и фенилбутазон (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

Средства, которые повышают поглощение iRNA на клеточном уровне, также можно добавлять к фармацевтическим и другим композициям по настоящему изобретению. Например, катионные липиды, такие как липофектин (Junichi et al, патент США № 5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (Lollo et al., заявка согласно PCT WO 97/30731), также, как известно, повышают поглощение dsRNA клетками. Примеры коммерчески доступных реагентов для трансфекции включают, среди прочего, например, Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), 293fectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Cellfectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), DMRIE-C™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), RNAiMAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Oligofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Optifect™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), реагент для трансфекции X-tremeGENE Q2 (Roche; Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомальной трансфекции DOTAP (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомальной трансфекции DOSPER (Грензахерштрассе, Швейцария) или Eugene (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент Transfectam® (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент для трансфекции TransFast™ (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-20 (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-50 (Promega; Мэдисон, Висконсин), DreamFect™ (OZ Biosciences; Марсель, Франция), EcoTransfect (OZ Biosciences; Марсель, Франция), реагент для трансфекции TransPass^a D1 (New England Biolabs; Ипсвич, Массачусетс, США), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции Perfectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции NeuroPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER 2 (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции Cytofectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции VasculoPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции TroganPORTER™ (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), RiboFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), PlasFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), UniFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США), SureFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США) или HiFect™ (B-Bridge International, Маунтин-Вью, Калифорния, США).

Для повышения проникновения введенных нуклеиновых кислот можно использовать другие средства, в том числе гликоли, такие как этиленгликоль и пропиленгликоль, пирролы, такие как 2-пиррол, азоны и терпены, такие как лимонен и ментон.

v. Носители.

В состав некоторых композиций по настоящему изобретению также входят соединения-носители. Используемые в данном документе "соединение-носитель" или "носитель" может обозначать нуклеиновую кислоту или ее аналог, которые являются инертными (т.е. не обладают биологической активностью *per se*), но распознаются в качестве нуклеиновой кислоты *in vivo* процессами, которые снижают биодоступность нуклеиновой кислоты, обладающей биологической активностью, например, путем разрушения биологически активной нуклеиновой кислоты или путем содействия ее удалению из кровотока. Совместное введение нуклеиновой кислоты и соединения-носителя, обычно с избытком последнего вещества, может привести к существенному сокращению количества нуклеиновой кислоты, извлекаемой в печени, почках или других внесосудистых депо, предположительно вследствие конкуренции между соединением-носителем и нуклеиновой кислотой за общий рецептор. Например, извлечение частично фосфотиоатной dsRNA в ткани печени может быть снижено при ее совместном введении с полиинозиновой кислотой, сульфатом декстрана, полицитидиновой кислотой или 4-ацетамидо-4'-изотиоцианостильбен-2,2'-дисульфоновой кислотой (Miyao et al., *DsRNA Res. Dev.*, 1995, 5, 115-121; Takakura et al., *DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177-183).

vi. Наполнители.

В отличие от соединения-носителя "фармацевтический носитель" или "наполнитель" представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующее средство или любую другую фармакологически инертную среду для доставки одной или нескольких нуклеиновых кислот в организм животного. Наполнитель может быть жидким или твердым веществом, и его выбирают с учетом предполагаемого способа введения так, чтобы обеспечить необходимый общий объем, консистенцию и т. д. при объединении с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Типичные фармацевтические носители включают без ограничения связывающие средства (например, прежелатинизированный маисовый крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и т.д.); наполнители (например, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин, сульфат кальция, этилцеллюлозу, полиакрилаты или гидрофосфат кальция и т.д.); смазывающие вещества (например, стеараты магния, тальк, кремнезем, коллоидный диоксид кремния, стеариновую кислоту, стеараты металлов, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоли, бензоат натрия, ацетат натрия и т.д.); разрыхлители (например, крахмал, крахмалгликолят натрия и т. д.) и смачивающие средства (например, лаурилсульфат натрия и т.д.).

Фармацевтически приемлемые органические или неорганические наполнители, подходящие для введения, отличного от парентерального, которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами, также можно применять для составления композиций по настоящему изобретению. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают без ограничения воду, растворы солей, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т.п.

Составы для местного введения нуклеиновых кислот могут включать стерильные и нестерильные водные растворы, неводные растворы в обычных растворителях, в таких как спирты, или растворы нуклеиновых кислот в жидких или твердых масляных основах. Растворы также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Можно применять фармацевтически приемлемые органические или неорганические наполнители, подходящие для введения, отличного от парентерального, которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами.

Подходящие фармацевтически приемлемые наполнители включают без ограничения воду, растворы солей, спирт, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т.п.

vii. Другие компоненты.

Композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, традиционно встречающиеся в фармацевтических композициях, при уровнях применения, установленных в данной области. Так, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные материалы, такие как например противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства, или могут содержать дополнительные материалы, применимые для физического составления композиций по настоящему изобретению в виде различных лекарственных форм, такие как красители, ароматизирующие вещества, консерванты, антиоксиданты, замутнители, загустители и стабилизаторы. Однако такие материалы при добавлении не должны в значительной степени препятствовать проявлению биологической активности компонентов композиций по настоящему изобретению. Составы можно подвергать стерилизации и, при необходимости, смешиванию со вспомогательными средствами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими средствами, эмульгаторами, солями для оказания влияния на осмотическое давление, буферами, красящими веществами, ароматизаторами и/или отдушками и т.п., которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновой кислотой(ами) состава.

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

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции, представленные в настоящем изобретении, включают (а) одно или несколько соединений, представляющих собой iRNA, и (b) одно или несколько средств, которые действуют по механизму, отличному от RNAi, и которые применимы при лечении гемолитического нарушения. Примеры таких средств включают без ограничения противовоспалительное средство, средства против стеатоза, противовирусное средство и/или средство против фиброза. Кроме того, другие вещества, обычно используемые для защиты печени, такие как силимарин, также можно применять в сочетании с iRNA, описанными в данном документе. Другие средства, применимые для лечения заболеваний печени, включают телбивудин, энтекавир и ингибиторы протеазы, такие как теллапревир и другие, раскрытые, например, в публикациях заявок на патенты США №№ 2005/0148548, 2004/0167116 и 2003/0144217 от Tung et al., а также в публикации заявки на патент США № 2004/0127488 от Hale et al.

Токсичность и терапевтическая эффективность таких соединений могут быть определены с помощью стандартных фармацевтических процедур на культурах клеток или экспериментальных животных, например, для определения LD50 (дозы, летальной для 50% популяции) и ED50 (дозы, терапевтически

эффективной у 50% популяции). Соотношение доз, обуславливающих токсический и терапевтический эффекты, представляет собой терапевтический индекс и его можно выразить как соотношение LD50/ED50. Предпочтительными являются соединения, которые характеризуются высоким терапевтическим индексом.

Данные, полученные в анализах на культурах клеток и в исследованиях на животных, можно применять при составлении диапазона доз для применения у людей. В настоящем изобретении дозировка композиций, представленных в данном документе, как правило, находится в пределах диапазонах циркулирующих концентраций, который включает ED50 с малой токсичностью или без таковой. Дозировка может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от используемых лекарственной формы и пути введения. Для любого соединения, применяемого в способах, представленных в настоящем изобретении, терапевтически эффективную дозу можно первоначально установить по результатам анализов на культурах клеток. Для животных моделей дозу можно составлять таким образом, чтобы достичь диапазона циркулирующей концентрации в плазме крови соединения или при необходимости полипептидного продукта целевой последовательности (например, достижения сниженной концентрации полипептида), включающего IC50 (т. е. концентрацию исследуемого соединения, при которой достигается полумаксимальное ингибирование симптомов), определенную на культуре клеток. Такую информацию можно применять для более точного определения доз, применимых у людей. Уровни в плазме крови можно измерять, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнении к введению, обсуждаемому выше, iRNA, представленные в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными средствами, эффективными в лечении патологических процессов, опосредованных экспрессией PCSK9. В любом случае врач, осуществляющие применение, может корректировать количество и временные рамки введения iRNA, исходя из результатов, наблюдаемых при применении стандартных показателей эффективности, известных из уровня техники или описанных в данном документе.

VI. Наборы.

В настоящем изобретении также предусмотрены наборы для применения любого из средств на основе iRNA и/или осуществления любого из способов по настоящему изобретению. Такие наборы включают одно или несколько RNAi-средств и инструкции по применению, например инструкции по ингибированию экспрессии PCSK9 в клетке путем приведения клетки в контакт со средством(ами) для RNAi в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии PCSK9. Наборы необязательно могут дополнительно содержать средства для приведения клетки в контакт со RNAi-средством (например, устройство для инъекции) или средства для измерения степени ингибирования PCSK9 (например, средства для измерения степени ингибирования экспрессии мРНК белка PCSK9). Такие средства для измерения степени ингибирования PCSK9 могут включать средства для получения образца от субъекта, как, например, образца плазмы крови. Наборы по настоящему изобретению необязательно могут дополнительно содержать средства для введения средства(средств) для RNAi субъекту или средства для определения терапевтически эффективного или профилактически эффективного количества.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое значение, которое обычно понятно специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, можно применять при практическом осуществлении или тестировании iRNA и способов, описанных в настоящем изобретении, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на выдачу патентов, патенты и другие литературные источники, упоминаемые в данном документе, а также перечень последовательностей и фигуры включены посредством ссылки во всей своей полноте. В случае конфликта, настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не подразумеваются как ограничивающие.

Примеры

Пример 1. Синтез олигонуклеотидов, конъюгированных с GalNAc.

Разрабатывали и синтезировали серию siRNA-дуплексов, нацеливающихся на нуклеотиды 3544-3623 гена PCSK9 человека (SEQ ID NO:1). Эти самые последовательности также синтезировали с различными модификациями нуклеотидов и конъюгировали с трехвалентным GalNAc. Последовательности смысловой и антисмысловой нитей модифицированных дуплексов показаны в табл. 1.

Таблица В. Сокращения нуклеотидных мономеров, используемые в представлении последовательностей нуклеиновой кислоты.

Сокращение	Нуклеотид (ы)
A	аденозин-3'-фосфат
Ab	бета-L-аденозин-3'-фосфат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-фтораденозин-3'-фосфотиоат
As	аденозин-3'-фосфотиоат
C	цитидин-3'-фосфат
Cb	бета-L-цитидин-3'-фосфат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфотиоат
Cs	цитидин-3'-фосфотиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gb	бета-L-гуанозин-3'-фосфат
Gbs	бета-L-гуанозин-3'-фосфотиоат
Gf	2'-фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-фторгуанозин-3'-фосфотиоат
Gs	гуанозин-3'-фосфотиоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Сокращение	Нуклеотид (ы)
Tfs	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
Ts	5-метилуридин-3'-фосфотиоат
U	уридин-3'-фосфат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин-3'-фосфотиоат
Us	уридин-3'-фосфотиоат
N	любой нуклеотид (G, A, C, T или U)
a	2'-O-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-O-метиладенозин-3'-фосфотиоат
c	2'-O-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-O-метилцитидин-3'-фосфотиоат
g	2'-O-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-O-метилгуанозин-3'-фосфотиоат
t	2'-O-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-O-метил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
u	2'-O-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-O-метилуридин-3'-фосфотиоат
dT	2'-дезокситимидин-3'-фосфат
dTs	2'-дезокситимидин-3'-фосфотиоат
dU	2'-деоксиуридин-3'-фосфат
dUs	2'-деоксиуридин-3'-фосфотиоат
s	фосфотиоатная связь
L96	N-[трис (GalNAc-алкил)-амидодеканол]-4-гидроксипропиол-Нур-(GalNAc-алкил)3
(Aeo)	2'-O-метоксиэтиладенозин-3'-фосфат
(Aeos)	2'-O-метоксиэтиладенозин-3'-фосфотиоат
(Geo)	2'-O-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфат
(Geos)	2'-O-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфотиоат
(Teo)	2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфат
(Teos)	2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
(m5Ceo)	2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфат
(m5Ceos)	2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфотиоат
(A3m)	3'-O-метиладенозин-2'-фосфат
(A3mx)	3'-O-метилксилофуранозиладенозин-2'-фосфат
(G3m)	3'-O-метилгуанозин-2'-фосфат
(G3mx)	3'-O-метилксилофуранозилгуанозин-2'-фосфат
(C3m)	3'-O-метилцитидин-2'-фосфат
(C3mx)	3'-O-метилксилофуранозилцитидин-2'-фосфат

(U3m)	3'-О-метилуридин-2'-фосфат
(U3mx)	3'-О-метилксилуридин-2'-фосфат
(Chd)	2'-О-гексадецилцитидин-3'-фосфат
(pshe)	гидроксиэтилфосфотиоат
(Uhd)	2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфат
(Tgn)	Тимидин-гликоль-нуклеиновая кислота (GNA), S-изомер
(Cgn)	Цитидин-гликоль-нуклеиновая кислота (GNA)
(Chd)	2'-О-гексадецилцитидин-3'-фосфат
(Ggn)	2'-О-гексадецилцитидин-3'-фосфат
(Agn)	Аденозин-гликоль-нуклеиновая кислота (GNA)
P	5'-фосфат
(m5Cam)	2'-О- (N-ацетилметил)-5-метилцитидин-3'-фосфат
(m5Cams)	2'-О- (N-ацетилметил)-5-метилцитидин-3'-фосфотиоат
(Tam)	2'-О- (N-ацетилметил) тимидин-3'-фосфат
(Tams)	2'-О- (N-ацетилметил) тимидин-3'-фосфотиоат
(Aam)	2'-О- (N-ацетилметил) аденозин-3'-фосфат
(Aams)	2'-О- (N-ацетилметил) аденозин-3'-фосфотиоат
(Gam)	2'-О- (N-ацетилметил) гуанозин-3'-фосфат
(Gams)	2'-О- (N-ацетилметил) гуанозин-3'-фосфотиоат
(Uyh)	2'-О- (1-гексил-4-метил-1,2,3-триазолил)-уридин-3'-фосфат
(Ayh)	2'-О- (1-гексил-4-метил-1,2,3-триазолил)-аденозин-3'-фосфат
(Gyh)	2'-О- (1-гексил-4-метил-1,2,3-триазолил)-гуанозин-3'-фосфат
(Cyh)	2'-О- (1-гексил-4-метил-1,2,3-триазолил)-цитидин-3'-фосфат
(iA)	инвертированный аденозин-5'-фосфат
(iC)	инвертированный цитидин-5'-фосфат

Таблица 1. Средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi), нацеливающиеся на нуклеотиды 3544-3623 PCSK9 человека (SEQ ID NO:1)

ID дуплекса	ID смысловой нити	SEQ ID NO:	Последовательность смысловой нити (5'-3')	Начало в NM_174936.3	ID антисмысловой нити	SEQ ID NO:	Последовательность антисмысловой нити (5'-3')
AD-53806	A-110717	7	CfaAfgCfaGfaCfaFufuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	8	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-53806	A-110717	9	CfaAfgCfaGfaCfaFufuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	10	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-53806	A-110717	11	CfaAfgCfaGfaCfaFufuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	12	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-53806	A-110717	13	CfaAfgCfaGfaCfaFufuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	14	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-53806	A-110717	15	CfaAfgCfaGfaCfaFufuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	16	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-53806	A-110717	17	CfaAfgCfaGfaCfaFufuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	18	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-53806	A-110717.6	19	CfaAfgCfaGfaCfaFufuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	20	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-53806	A-110717.7	21	CfaAfgCfaGfaCfaFufuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	22	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-53806	A-110717.8	23	CfaAfgCfaGfaCfaFufuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	24	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu

AD-53806	A-110717.9	25	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	26	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56979	A-116393	27	caAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	28	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56979	A-116393	29	caAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	30	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56975	A-116394	31	(iC) aAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	32	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56975	A-116394	33	(iC) aAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	34	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56975	A-116394	35	(iC) aAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	36	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56975	A-116394	37	(iC) aAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	38	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56975	A-116394	39	(iC) aAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	40	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56983	A-116400	41	CbaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	42	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56983	A-116400	43	CbaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	44	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56983	A-116400	45	CbaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	46	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56983	A-116400	47	CbaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	48	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56983	A-116400	49	CbaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	50	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56977	A-116406	51	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	52	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56977	A-116406	53	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	54	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56977	A-116406	55	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	56	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56976	A-116407	57	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaucUfuUfuUfL96	3544	A-109589	58	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56976	A-116407	59	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaucUfuUfuUfL96	3544	A-109589	60	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56980	A-116408	61	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucUfuUfuUfL96	3544	A-109589	62	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56980	A-116408	63	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucUfuUfuUfL96	3544	A-109589	64	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56984	A-116409	65	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucUfuUfuUfL96	3544	A-109589	66	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56984	A-116409	67	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucUfuUfuUfL96	3544	A-109589	68	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56987	A-116410	69	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucUfuUfuUfL96	3544	A-109589	70	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56987	A-116410	71	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucUfuUfuUfL96	3544	A-109589	72	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56991	A-116415	73	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucuuuL96	3544	A-109589	74	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56993	A-116416	75	CfaagcagaCfAfUfuUfaucuuuuL96	3544	A-109589	76	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56995	A-116417	77	CfaagcagaCfAfUfuUfaucuuuuL96	3544	A-109589	78	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56978	A-116418	79	CfaAfgCfCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	80	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56978	A-116418	81	CfaAfgCfCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	82	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56981	A-116419	83	CfaAfgCfCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	84	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu

AD-56985	A-116420	85	CfaAfGfCfaGfaCfAfUfuUfaUfUfCfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	86	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56988	A-116421	87	CfaAfGfCfAfGfAcCfAfUfuUfaUfUfCfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	88	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56988	A-116421	89	CfaAfGfCfAfGfAcCfAfUfuUfaUfUfUfCfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	90	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56988	A-116421	91	CfaAfGfCfAfGfAcCfAfUfuUfaUfUfUfCfUfuUfuUfL96	3544	A-109589	92	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56982	A-116426	93	CfaAfgcaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	94	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56982	A-116426	95	CfaAfgcaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	96	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56986	A-116428	97	CfaAfgCfagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	98	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56986	A-116428	99	CfaAfgCfagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	100	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56989	A-116430	101	CfaAfgCfaGfAcAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	102	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56990	A-116432	103	CfaAfgCfaGfaCfAfuuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	104	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56992	A-116434	105	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	106	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56992	A-116434	107	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	108	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56994	A-116436	109	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuuuUfL96	3544	A-109589	110	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56994	A-116436	111	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuuuUfL96	3544	A-109589	112	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56996	A-116438	113	caagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	114	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57001	A-116440	115	CfaAfgcagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	116	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57007	A-116442	117	CfaAfgCfaGfaCfAfuuuaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	118	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57013	A-116444	119	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	120	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57019	A-116446	121	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuuuuL96	3544	A-109589	122	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57022	A-116448	123	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfUfUfuUfL96	3544	A-109589	124	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57025	A-116449	125	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	126	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56997	A-116450	127	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	128	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57002	A-116452	129	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	130	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57008	A-116453	131	CfaAfgCfaGfAcCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	132	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57014	A-116454	133	CfaAfgCfAfGfAcCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	134	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57020	A-116455	135	CfAfAfGfCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-1095893	136	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57020	A-116455	137	CfAfAfGfCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-1095893	138	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57026	A-116457	139	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-1095893	140	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57003	A-116460	141	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	142	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57009	A-116462	143	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	144	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu

AD-57015	A-116464	145	CfaAfgCfaGfacaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	146	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57023	A-116467	147	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	148	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57027	A-116469	149	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	150	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56998	A-116471	151	CfaAfgCfagaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	152	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57004	A-116473	153	CfaAfgcaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	154	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57010	A-116475	155	CfaagCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	156	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57016	A-116477	157	caAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	158	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56999	A-116479	159	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	160	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-56999	A-116479	161	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	162	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57021	A-116481	163	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	164	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57024	A-116483	165	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	166	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57005	A-116486	167	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	168	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57011	A-116488	169	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	170	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57017	A-116490	171	CfaAfgCfagaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3544	A-109589	172	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57000	A-116492	173	Cf (Aeo) Af (Geo) CfaGfaCfaUfuUfaUfcUf (Teo) Uf (Teo) UfL96	3544	A-109589	174	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57000	A-116492	175	Cf (Aeo) Af (Geo) CfaGfaCfaUfuUfaUfcUf (Teo) Uf (Teo) UfL96	3544	A-109589	176	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57000	A-116492	177	Cf (Aeo) Af (Geo) CfaGfaCfaUfuUfaUfcUf (Teo) Uf (Teo) UfL96	3544	A-109589	178	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57006	A-116494	179	Cf (Aeo) Af (Geo) CfaGfaCfaUfuUf (Aeo) Uf (m5Ceo) Uf (Teo) Uf (Teo) UfL96	3544	A-109589	180	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57006	A-116494	181	Cf (Aeo) Af (Geo) CfaGfaCfaUfuUf (Aeo) Uf (m5Ceo) Uf (Teo) Uf (Teo) UfL96	3544	A-109589	182	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57006	A-116494	183	Cf (Aeo) Af (Geo) CfaGfaCfaUfuUf (Aeo) Uf (m5Ceo) Uf (Teo) Uf (Teo) UfL96	3544	A-109589	184	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57012	A-116498	185	Cf (Aeo) Af (Geo) CfaGfaCfaUfuUfaUfcUf (Teo) Uf (Teo) UfL96	3544	A-109589	186	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-57018	A-116500	187	Cf (Aeo) Af (Geo) CfaGfaCfaUfuUf (Aeo) Uf (m5Ceo) Uf (Teo) Uf (Teo) UfL96	3544	A-109589	188	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu
AD-53812	A-110718	189	AfaGfcAfgAfcAfuUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3545	A-109591	190	uCfaAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfufGfsc
AD-53818	A-110719	191	AfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3546	A-109593	192	uCfcAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfusUfsg
AD-53766	A-110679	193	GfcAfgAfcAfuUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3547	A-109513	194	aCfcCfaAfaAfgAfuUfaUfcUfuUfGfcsUfsc
AD-53772	A-110680	195	AfgAfcAfuUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	3549	A-109515	196	aGfaCfcCfaAfaAfgauAfaAfuGfufCfusGfsc

AD-53824	A-110720	197	GfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuGfgGfuCfuUfL96	3550	A-109595	198	aAfgAfcCfcAfaAfagaUfaAfaUfgUfcsUfsg
AD-53778	A-110681	199	AfcAfuUfuAfuCfuUfuUfgGfgUfcUfgUfL96	3551	A-109517	200	aCfaGfaCfcCfaAfaagAfuAfaAfuGfusCfsu
AD-53784	A-110682	201	UfuUfaUfcUfuUfuGfgGfuCfuGfuCfcUfL96	3554	A-109519	202	aGfgAfcAfgAfcCfcaaAfaGfaUfaAfasUfsg
AD-53829	A-110721	203	UfuAfuCfuUfuUfgGfgUfcUfgUfcCfuUfL96	3555	A-109597	204	aAfgGfaCfaGfaCfccaAfaAfgAfuAfasAfsu
AD-53790	A-110683	205	UfaUfcUfuUfuGfgGfuCfuGfuCfcUfcUfL96	3556	A-109521	206	aGfaGfgAfcAfgAfcccAfaAfaGfaUfasAfsa
AD-53835	A-110722	207	AfuCfuUfuUfgGfgUfcUfgUfcCfuCfuUfL96	3557	A-109599	208	aAfgAfgGfaCfaGfaccCfaAfaAfgAfusAfsa
AD-53796	A-110684	209	UfcUfuUfuGfgGfuCfuGfuCfcUfcUfcUfL96	3558	A-109523	210	aGfaGfaGfgAfcAfgacCfcAfaAfaGfasUfsa
AD-53802	A-110685	211	UfuUfuGfgGfuCfuGfuCfcUfcUfcUfL96	3560	A-109525	212	aCfaGfaGfaGfgAfcagAfcCfcAfaAfasGfsa
AD-53808	A-110686	213	UfuUfgGfgUfcUfgUfcCfuCfuCfuCfuUfL96	3561	A-109527	214	aAfcAfgAfgAfgGfacaGfaCfcCfaAfasAfsu
AD-53795	A-110723	215	UfuGfgGfuCfuGfuCfcUfcUfcUfL96	3562	A-109601	216	aAfaCfaGfaGfaGfgAfcAfcCfcAfasAfsa
AD-53801	A-110724	217	UfgGfgUfcUfgUfcCfcUfcCfuGfuUfgAfl96	3563	A-109603	218	uCfaAfcAfgAfgAfggaCfaGfaCfcCfasAfsa
AD-53807	A-110725	219	GfgGfuCfuGfuCfcUfcUfcUfL96	3564	A-109605	220	uGfcAfaCfaGfaGfaggAfcAfgAfcCfcsAfsa
AD-53814	A-110687	221	GfgUfcUfgUfcUfcUfcCfuGfuUfgCfcUfL96	3565	A-109529	222	aGfgCfaAfcAfgAfgagGfaCfaGfaCfcsCfsa
AD-53820	A-110688	223	GfuCfuGfuCfcUfcUfcUfgUfuGfcCfuUfL96	3566	A-109531	224	aAfgGfcAfaCfaGfagaGfgAfcAfgAfcsc
AD-53825	A-110689	225	UfcUfgUfcCfuCfuCfuGfuUfgCfcUfuUfL96	3567	A-109533	226	aAfaGfgCfaAfaAfcagAfgGfaCfaGfasCfsc
AD-53831	A-110690	227	CfuGfuCfcUfcUfcUfgUfuGfcCfuUfuUfL96	3568	A-109535	228	aAfaAfgGfcAfaCfagaGfaGfgAfcAfgsAfsu
AD-53791	A-110691	229	UfgUfcCfuCfuCfuGfuUfgCfcUfuUfuUfL96	3569	A-109537	230	aAfaAfaGfgCfaAfcagAfgGfaCfasGfsa
AD-53797	A-110692	231	GfuCfcUfcUfcUfgUfuGfcCfuUfuUfL96	3570	A-109539	232	uAfaAfaAfgGfcAfaCfaGfaGfgAfcAfsu
AD-58902		233	UfsusUfuCfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfL96	3597		234	asAfsuGfaAfaAfcAfgguCfuAfgAfaAfasgsu
AD-53803	A-110693	235	UfuUfcUfaGfaCfcUfgUfuUfuGfcUfuUfL96	3600	A-109541	236	aAfaGfcAfaAfaCfaggUfcUfaGfaAfasAfsu
AD-59232		237	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3600		238	PasCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59212		239	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3600		240	PasCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-53809	A-110694	241	UfuCfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfL96	3601	A-109543	242	aAfaAfgCfaAfaAfcagGfuCfuAfgAfasAfsa
AD-53815		243	CfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3601		244	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa
AD-579280		245	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3601		246	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59182		247	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3601		248	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59184		249	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3601		250	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59186		251	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3601		252	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59171		253	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3601		254	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59176		255	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3601		256	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa

AD-59170		257	CfsusagacCfuGfuuuugCfuuu uguL96	3601		258	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59175		259	CfsusagacCfuGfuuuugcuuuu guL96	3601		260	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59179		261	csusagacCfuGfuuuugcuuuug uL96	3601		262	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59218		263	CfsusAfgAfcCfuGfuuuugCfu uuuguL96	3601		264	asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGf uCfuAfgsasa
AD-59222		265	CfsusAfgAfcCfuGfuuuugcuu uuguL96	3601		266	asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfu fuAfgsasa
AD-59226		267	CfsusagacCfuGfuuuugCfuuu uguL96	3601		268	asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGf uCfuAfgsasa
AD-59230		269	CfsusagacCfuGfuuuugcuuuu guL96	3601		270	asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGf uCfuAfgsasa
AD-59235		271	csusagacCfuGfuuuugcuuuug uL96	3601		272	asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGf uCfuAfgsasa
AD-59207		273	CfsusAfgAfcCfuGfuuuugCfu uuuguL96	3601		274	asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGf uCfuagsasa
AD-59211		275	CfsusAfgAfcCfuGfuuuugcuu uuguL96	3601		276	asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGf uCfuagsasa
AD-59215		277	CfsusagacCfuGfuuuugCfuuu uguL96	3601		278	asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGf uCfuagsasa
AD-59219		279	CfsusagacCfuGfuuuugcuuuu guL96	3601		280	asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGf uCfuagsasa
AD-59223		281	csusagacCfuGfuuuugcuuuug uL96	3601		282	asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGf uCfuagsasa
AD-59181		283	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfsgUfL96	3601		284	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59172		285	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfsgUfL96	3601		286	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59177		287	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfsuUfsuUfsgUfL96	3601		288	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59180		289	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfsuUfsuUfsgUfL96	3601		290	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59183		291	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfsgUfL96	3601		292	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59185		293	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfsgUfL96	3601		294	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59173		295	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgC fuuuugsuL96	3601		296	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59236		297	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfsgUfL96	3601		298	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfu CfsuAfgsasa
AD-59216		299	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfsgUfL96	3601		300	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfu CfsuAfgsasa
AD-59220		301	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfsgUfL96	3601		302	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfu CfsuAfgsasa
AD-59224		303	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfsuUfsuUfsgUfL96	3601		304	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfu CfsuAfgsasa
AD-59228		305	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfsuUfsuUfsgUfL96	3601		306	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfu CfsuAfgsasa
AD-59233		307	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfsgUfL96	3601		308	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfu CfsuAfgsasa
AD-59237		309	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfsgUfL96	3601		310	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfu CfsuAfgsasa
AD-59209		311	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgC fuuuugsuL96	3601		312	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfu CfsuAfgsasa
AD-59208		313	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfsgUfL96	3601		314	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfu CfsuAfgsasa
AD-59210		315	csusAGAccuGuuuuGuuuuGuL 96	3601		316	AscsAAAAcAAAAcAGGucuAGsasa

AD-59227		317	CfsusAfgAfcCfuGfuuuuGfcu uuuGfuL96	3601		318	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC GfGfuuuAfgGfsasa
AD-59231		319	CfsusAfgAfcCfuGfuuuuGfcu uuuGfuL96	3601		320	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGf GfuuuAfgGfsasa
AD-59198		321	(C3m) usAfgAfcCfuGfuUfuU fgCfuUfuUfgUfL96	3601		322	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59200		323	(C3m) (U3m) AfgAfcCfuGfuUf fuUfgCfuUfuUfgUfL96	3601		324	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59203		325	(m5Cam) usAfgAfcCfuGfuUfuU uUfgCfuUfuUfgUfL96	3601		326	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59204		327	(m5Cam) (Tam) AfgAfcCfuGfuU fuUfgCfuUfuUfgUfL96	3601		328	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59188		329	(m5Cams) (Tams) AfgAfcCfuG fuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3601		330	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59191		331	(m5Cams) usAfgAfcCfuGfuUfuU fuUfgCfuUfuUfgUfL96	3601		332	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59213		333	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfgUfL96	3601		334	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgs (A3m) a
AD-59217		335	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfgUfL96	3601		336	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAf (G3m) (A3m) a
AD-59221		337	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfgUfL96	3601		338	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgs (Aam) a
AD-59225		339	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfgUfL96	3601		340	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAf (Gam) (Aam) a
AD-59229		341	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfgUfL96	3601		342	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgs (Aams) a
AD-59234		343	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfgUfL96	3601		344	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAf (Gams) (Aams) a
AD-59238		345	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfgUfL96	3601		346	(A3m) CfsaAfaAfgCfaAfaacAfgG fuCfuAfgsasa
AD-59241		347	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfgUfL96	3601		348	as (C3m) aAfaAfgCfaAfaacAfgGf uCfuAfgsasa
AD-59245		349	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfgUfL96	3601		350	(Aam) CfsaAfaAfgCfaAfaacAfgG fuCfuAfgsasa
AD-59250		351	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfg CfuUfuUfgUfL96	3601		352	as (m5Cam) aAfaAfgCfaAfaacAfg GfuCfuAfgsasa
AD-59196		353	usAfgAfcCfuGfuUfuUfgCf uUfuUfgUfL96	3601		354	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59189		355	AfsgAfcCfuGfuUfuUfgCfu UfuUfgUfL96	3601		356	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59190		357	usCfsuAfgAfcCfuGfuUfuUf gCfuUfuUfgUfL96	3601		358	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59192		359	UfsgCfuAfgAfcCfuGfuUfuUf UfgCfuUfuUfgUfL96	3601		360	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59240		361	CfsusAfgAfcCfuGfuuuugCfu uuuguL96	3601		362	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfu CfuAfgs (A3m) a
AD-59244		363	CfsusAfgAfcCfuGfuuuugCfu uuuguL96	3601		364	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfu CfuAfgsasa
AD-59202.7		365	(C3m) usagaccguuuugcuuu guL96	3601		366	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59195		367	(C3m) usAfgAfcCfuGfuuuugC fuuuuguL96	3601		368	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59249		369	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgC fuuuuguL96	3601		370	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgs (A3m) a
AD-59254		371	CfsusAfgAfcCfuGfuuuugCfu uuuguL96	3601		372	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgs (A3m) a
AD-59259		373	(C3m) usAfgAfcCfuGfuuuugC fuuuuguL96	3601		374	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgs (A3m) a
AD-59264		375	(C3m) usagaccguuuugcuuu guL96	3601		376	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgs (A3m) a

AD-59264		377	(C3m) usagaccuuuuugcuuuuu guL96	3601		378	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgs (A3m) a
AD-59255		379	CsusagaccuGFUUFUuugcuuuu guL96	3601		380	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgs (A3m) a
AD-57928		381	CfsusAfgAfcCfuGFUUFUfUfg CfuUfuUfgUfL96	3601		382	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-58893		383	CfsuAfgAfcCfuGFUUFUfUfgC fuUfuUfgUfL96	3601		384	asCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCf uAfgasa
AD-58894		385	CfusAfgAfcCfuGFUUFUfUfgC fuUfuUfgUfL96	3601		386	aCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCf uAfgsaa
AD-58895		387	CfuAfgAfcCfuGFUUFUfUfgCf uUfuUfgUfL96	3601		388	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-58896		389	CfsusAfgAfcCfuGFUUFUfUfg CfuUfuUfgUfL96	3601		390	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu Afgaa
AD-58897		391	CfsusAfgAfcCfuGFUUFUfUfg gCfuUfuUfgUfL96	3601		392	asCfsasAfaAfgCfaAfaacAfgGfu CfuAfgsasa
AD-58898		393	CfsusAfgAfcCfuGFUUFUfUfg gCfuUfuUfgUfL96	3601		394	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGf uCfuAfgsasa
AD-58899		395	CfsusAfgAfcCfuGFUUFUfUfg gCfuUfuUfgUfL96	3601		396	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGf uCfuAfgsasa
AD-53813	A-110726	397	UfcUfaGfaCfcUfGFUUFUfUfgC UfuUfuUfL96	3602	A-109607	398	aAfaAfaGfaCfaAfaacAfgGfuCfa GfasAfsa
AD-59246		399	CfsusAfgAfcCfuGFUUFUfUfg CfuUfuUfgUfL96	3602		400	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59253		401	usAfgAfcCfuGFUUFUfUfgCf uUfuUfgUfL96	3602		402	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59242		403	AfgsAfcCfuGFUUFUfUfgCfu UfuUfgUfL96	3602		404	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59253		405	usAfgAfcCfuGFUUFUfUfgCf uUfuUfgUfL96	3602		406	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-59258		407	usagAfcCfuGFUUFUfUfgCfu UfuUfgUfL96	3602		408	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fuAfgsasa
AD-53815	A-110695	409	CfuAfgAfcCfuGFUUFUfUfgCfu UfuUfgUfL96	3603	A-109545	410	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu AfgsAfsa
AD-53815	A-110695	411	CfuAfgAfcCfuGFUUFUfUfgCfu UfuUfgUfL96	3603	A-109545	412	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu AfgsAfsa
AD-53815	A-110695	413	CfuAfgAfcCfuGFUUFUfUfgCfu UfuUfgUfL96	3603	A-109545	414	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu AfgsAfsa
AD-56633	A-115520	415	cuAfgAfcCfuGFUUFUfUfgCfuU fuUfgUfL96	3603	A-109545	416	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu AfgsAfsa
AD-56617	A-115535	417	CfuagAfcCfuGFUUFUfUfgCfuU fuUfgUfL96	3603	A-109545	418	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu AfgsAfsa
AD-56623	A-115536	419	CfuagAfcCfuGFUUFUfUfgcuUf uUfgUfL96	3603	A-109545	420	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu AfgsAfsa
AD-56629	A-115537	421	CfuagAfcCfuGFUUFUfUfgcuUfu UfgUfL96	3603	A-109545	422	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu AfgsAfsa
AD-56635	A-115538	423	CfuagAfcCfuGFUUFUfUfgcuUfu guL96	3603	A-109545	424	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu AfgsAfsa
AD-56641	A-115539	425	CfuagaccuGFUUFUfUfgcuuuugu L96	3603	A-109545	426	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu AfgsAfsa
AD-56625	A-115542	427	CfuAfgAfcCfuGFUUFUfUfgCf uUfuUfgUfL96	3603	A-109545	428	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu AfgsAfsa
AD-56631	A-115543	429	CfuAfgAfcCfuGFUUFUfUfgCf fuUfuUfgUfL96	3603	A-109545	430	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu AfgsAfsa
AD-56637	A-115544	431	CfuAfgAfcCfuGFUUFUfUfgCf fuUfuUfgUfL96	3603	A-109545	432	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu AfgsAfsa
AD-56643	A-115545	433	CfuAfgAfcCfuGFUUFUfUfgGf CfuUfuUfgUfL96	3603	A-109545	434	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu AfgsAfsa
AD-56649	A-115546	435	CfuAfgAfcCfuGFUUFUfUfgGf fCfuUfuUfgUfL96	3603	A-109545	436	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu AfgsAfsa

AD-56626	A-115543	497	CfuAfgfAfcCfuGfUfUfuUfgfCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115548	498	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56632	A-115544	499	CfuAfgfAfcCfuGfUfUfuUfgfCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115548	500	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56638	A-115545	501	CfuAfgfAfcCfuGfUfUfuUfgfCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115548	502	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56644	A-115546	503	CFUfAfgfAfcCfuGfUfUfuUfgfCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115548	504	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56650	A-115547	505	CFUfAfgfAfcCfuGfUfUfuUfgfCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115548	506	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56656	A-110695	507	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115549	508	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56662	A-115542	509	CfuAfgfAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115549	510	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56668	A-115543	511	CfuAfgfAfcCfuGfUfUfuUfgfCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115549	512	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56673	A-115544	513	CfuAfgfAfcCfuGfUfUfuUfgfCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115549	514	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56678	A-115545	515	CfuAfgfAfcCfuGfUfUfuUfgfCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115549	516	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56683	A-115546	517	CFUfAfgfAfcCfuGfUfUfuUfgfCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115549	518	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56688	A-115547	519	CFUfAfgfAfcCfuGfUfUfuUfgfCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115549	520	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56657	A-115550	521	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115551	522	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56663	A-115552	523	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115553	524	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56669	A-115554	525	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115555	526	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56674	A-115556	527	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115557	528	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56679	A-115558	529	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115559	530	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56684	A-115560	531	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115561	532	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56689	A-115535	533	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115562	534	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56693	A-115520	535	cuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115563	536	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56658	A-115564	537	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115565	538	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56664	A-115566	539	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115567	540	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56670	A-115568	541	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115569	542	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56680	A-115572	543	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115573	544	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56685	A-115574	545	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115575	546	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56690	A-115542	547	CfuAfgfAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115576	548	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56694	A-115577	549	CFUfAfgfAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115578	550	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-56659	A-110695	551	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3603	A-115579	552	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa
AD-59214		553	AsGsAccuGuuuuGcuuuuGuL96	3603		554	AscsAAAAGCAAAACAGGucusAsG
AD-59251		555	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3603		556	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfusAfsa

AD-59261		557	AfsgsAfcCfuGfUfUfUfgCfu UfuUfgUfL96	3603		558	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fusasg
AD-59262		559	usAfsgAfcCfuGfUfUfUfgCf uUfuUfgUfL96	3603		560	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fusasg
AD-59265		561	csusAfgAfcCfuGfUfUfUfgC fuUfuUfgUfL96	3603		562	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fusasg
AD-53821	A-110696	563	UfaGfaCfcUfgUfUfUfgCfu UfuGfuAFL96	3604	A-109547	564	uAfcAfaAfaGfcAfaaacCfaGfgUfc UfasGfssa
AD-59256		565	usAfsgAfcCfuGfUfUfUfgCf uUfuUfgUfL96	3604		566	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fsusAf
AD-59247		567	gsAfscCfuGfUfUfUfgCfuUf uUfgUfL96	3604		568	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fsusa
AD-59252		569	AfsgsAfcCfuGfUfUfUfgCfu UfuUfgUfL96	3604		570	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fsusa
AD-59257		571	usAfsgAfcCfuGfUfUfUfgCf uUfuUfgUfL96	3604		572	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuC fsusa
AD-56665	A-115580	573	AfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfu UfgUfL96	3605	A-115581	574	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu sAfgs
AD-56671	A-115582	575	AfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfu ugUfL96	3605	A-115583	576	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCf usAfgs
AD-56676	A-115584	577	AfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUf fgUfL96	3605	A-115585	578	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCf usAfgs
AD-56681	A-115586	579	AfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfu fgUfL96	3605	A-115587	580	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCf usAfgs
AD-56686	A-115588	581	AfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfu fgUfL96	3605	A-115589	582	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCf usAfgs
AD-56691	A-115590	583	AfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfu fgUfL96	3605	A-115591	584	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCf usAfgs
AD-56695	A-115592	585	AfgacCfuGfUfUfUfgCfuUfu fgUfL96	3605	A-115593	586	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCf usAfgs
AD-56660	A-115594	587	agAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfu fgUfL96	3605	A-115595	588	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu fsAfgs
AD-56666	A-115596	589	AfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfu fUfgUfL96	3605	A-115597	590	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfus Afgs
AD-56672	A-115598	591	AfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfu uUfgUfL96	3605	A-115599	592	aCfaAfaagCfaAfaacAfgGfuCfus Afgs
AD-56677	A-115600	593	AfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfu uUfgUfL96	3605	A-115601	594	aCfaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfus Afgs
AD-56682	A-115602	595	AfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfu uUfgUfL96	3605	A-115603	596	aCfaAfaAfgCfaaaacAfgGfuCfus Afgs
AD-56687	A-115604	597	AfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfu uUfgUfL96	3605	A-115605	598	aCfaAfaAfgCfaAfaacagGfuCfus Afgs
AD-56692	A-115606	599	AfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfu uUfgUfL96	3605	A-115607	600	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfus Afgs
AD-56696	A-115608	601	AfGfAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfu uUfgUfL96	3605	A-115609	602	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfus Afgs
AD-56661	A-115580	603	AfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfu UfgUfL96	3605	A-115610	604	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu sasg
AD-56667	A-115611	605	gAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfuUf gUfL96	3605	A-115612	606	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfa usa
AD-59260		607	AfsgsAfcCfuGfUfUfUfgCfu UfuUfgUfL96	3605		608	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfus Cfus
AD-59248		609	gsAfscCfuGfUfUfUfgCfuUf uUfgUfL96	3605		610	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfus Cfus
AD-53826	A-110697	611	UfuUfuGfuAfaCfuUfgAfaGfa UfaUfuUfL96	3618	A-109549	612	aAfaUfaUfcUfuCfaagUfuAfcAfa AfasGfsc
AD-53832	A-110698	613	UfuUfgUfaAfcUfuUfgAfaGfa AfuUfuAFL96	3619	A-109551	614	uAfaAfuAfuCfuUfcaagUfaCfa AfasAfgs
AD-53792	A-110699	615	UfuGfuAfaCfuUfgGfaGfaUfa UfuUfaUfL96	3620	A-109553	616	aUfaAfaUfaUfcUfuAfgUfuAfc AfasAfsa

AD-53798	A-110700	617	UfgUfaAfcUfuGfAfAfGfAfUfuUfuUfuUfL96	3621	A-109555	618	aAfuAfaAfuAfuCfuucAfaGfuUfaCfasAfsa
AD-53819	A-110727	619	GfuAfaCfuUfgAfAfGfaUfaUfuUfaUfuUfL96	3622	A-109609	620	aAfaUfaAfaUfaUfcuuCfaAfgUfuAfcAfsa
AD-579285	A-117428	621	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3602	A-117429	622	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-60928	A-122701	623	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgAFL96	3602	A-122702	624	usCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-60929	A-122703	625	GfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3602	A-122704	626	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfcusu
AD-60930	A-122705	627	GfsasAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3602	A-122706	628	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuUfcusu
AD-60931	A-122707	629	GfsasUfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3602	A-122708	630	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfaUfcusu
AD-60932	A-122707	631	GfsasUfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3602	A-122709	632	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfaUfcusa
AD-60933	A-122710	633	CfsasUfcAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3602	A-122711	634	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuGfaUfgsasa
AD-60934	A-122712	635	CfsusUfcUfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3602	A-122713	636	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfaGfaAfgsasa
AD-60927	A-122714	637	CfsusAfcUfgCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3602	A-122715	638	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgCfaGfuAfgsasa
AD-579285	A-117428	639	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3602	A-117429	640	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-60906	A-117428	641	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3602	A-122309	642	asCfsaAfaAfgCf (Ayh) AfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-60907	A-117428	643	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3602	A-122310	644	asCfsaAfaAfgCfa (Ayh) aacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-60908	A-117428	645	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3602	A-122311	646	asCfsaAfaAfgCfaAf (Ayh) acAfgGfuCfuAfgsasa
AD-60909	A-117428	647	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3602	A-122312	648	asCfsaAfaAfgCfaAfa (Ayh) cAfgGfuCfuAfgsasa
AD-60910	A-117428	649	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3602	A-122313	650	asCfsaAfaAfgCf (Ayh) AfaacAf (Gyh) GfuCf (Uyh) Afgsasa
AD-60911	A-122307	651	Cfsus (Ayh) (Gyh) (Ayh) (Cyh) CfuGfUfUfuUf (Gyh) Cf (Uyh) Uf (Uyh) Uf (Gyh) UfL96	3602	A-117429	652	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-60912	A-122308	653	(Cyh) u (Ayh) (Gyh) (Ayh) (Cyh) CfuGfUfUfuUf (Gyh) Cf (Uyh) Uf (Uyh) Uf (Gyh) UfL96	3602	A-117429	654	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-60913	A-122307	655	Cfsus (Ayh) (Gyh) (Ayh) (Cyh) CfuGfUfUfuUf (Gyh) Cf (Uyh) Uf (Uyh) Uf (Gyh) UfL96	3602	A-122309	656	asCfsaAfaAfgCf (Ayh) AfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-60914	A-122307	657	Cfsus (Ayh) (Gyh) (Ayh) (Cyh) CfuGfUfUfuUf (Gyh) Cf (Uyh) Uf (Uyh) Uf (Gyh) UfL96	3602	A-122310	658	asCfsaAfaAfgCfa (Ayh) aacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-60915	A-122307	659	Cfsus (Ayh) (Gyh) (Ayh) (Cyh) CfuGfUfUfuUf (Gyh) Cf (Uyh) Uf (Uyh) Uf (Gyh) UfL96	3602	A-122311	660	asCfsaAfaAfgCfaAf (Ayh) acAfgGfuCfuAfgsasa
AD-579285	A-117428	661	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	3602	A-117429	662	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-60916	A-122307	663	Cfsus (Ayh) (Gyh) (Ayh) (Cyh) CfuGfUfUfuUf (Gyh) Cf (Uyh) Uf (Uyh) Uf (Gyh) UfL96	3602	A-122312	664	asCfsaAfaAfgCfaAfa (Ayh) cAfgGfuCfuAfgsasa
AD-60917	A-122307	665	Cfsus (Ayh) (Gyh) (Ayh) (Cyh) CfuGfUfUfuUf (Gyh) Cf (Uyh) Uf (Uyh) Uf (Gyh) UfL96	3602	A-122313	666	asCfsaAfaAfgCf (Ayh) AfaacAf (Gyh) GfuCf (Uyh) Afgsasa
AD-60918	A-122308	667	(Cyh) u (Ayh) (Gyh) (Ayh) (Cyh) CfuGfUfUfuUf (Gyh) Cf (Uyh) Uf (Uyh) Uf (Gyh) UfL96	3602	A-122309	668	asCfsaAfaAfgCf (Ayh) AfaacAfgGfuCfuAfgsasa

AD-60919	A-122308	669	(Cyh) u (Ayh) (Gyh) (Ayh) (Cyh)) CfuGfUfUfuUf (Gyh) Cf (Uyh) Uf (Uyh) Uf (Gyh) UfL96	3602	A-122310	670	asCfsaAfaAfgCfa (Ayh) aacAfgG fuCfuAfgsasa
AD-60920	A-122308	671	(Cyh) u (Ayh) (Gyh) (Ayh) (Cyh)) CfuGfUfUfuUf (Gyh) Cf (Uyh) Uf (Uyh) Uf (Gyh) UfL96	3602	A-122311	672	asCfsaAfaAfgCfaAf (Ayh) acAfg GfuCfuAfgsasa
AD-60921	A-122308	673	(Cyh) u (Ayh) (Gyh) (Ayh) (Cyh)) CfuGfUfUfuUf (Gyh) Cf (Uyh) Uf (Uyh) Uf (Gyh) UfL96	3602	A-122312	674	asCfsaAfaAfgCfaAfa (Ayh) cAfg GfuCfuAfgsasa
AD-60922	A-122308	675	(Cyh) u (Ayh) (Gyh) (Ayh) (Cyh)) CfuGfUfUfuUf (Gyh) Cf (Uyh) Uf (Uyh) Uf (Gyh) UfL96	3602	A-122313	676	asCfsaAfaAfgCf (Ayh) AfaacAf (Gyh) GfuCf (Uyh) Afgsasa
AD-58900		677	CfsasAfgCfaGfaCfaAfUfuUfaU fcUfuUfuUfL96	3602		678	asAfsaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgC fuUfgscsu
AD-59849	A-121244	679	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgcu uuuguL96	3602		680	asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuf gsasa
AD-60688	A-120188	681	csusagacCfuGfuuuugcuuuuguL 96	3602		682	asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuf gsasa
AD-60212	A-122088	683	csusagacCfuGfudTuugcuuuugu L96	3602		684	asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuc fuagsasa

Пример 2. Клиническое испытание фазы I в отношении AD-60212.

Рандомизированное, односторонне слепое, плацебоконтролируемое исследование фазы I, включающее группу с однократными нарастающими дозами (SAD) и группу с многократными нарастающими дозами (MAD), проводили с участием субъектов с повышенным уровнем холестерина липопротеинов низкой плотности (LDLc или LDL-C), принимающих статины или не принимающих их, чтобы оценить безопасность, переносимость, фармакокинетику и фармакодинамику AD-60212, вводимого подкожно.

Более конкретно, в фазе SAD исследования тестировали способность однократной подкожной фиксированной дозы, составляющей 25, 100, 300, 500 или 800 мг AD-60212 (ALN-PCSSc), снижать уровни как белка PCSK9, так и LDL-C у здоровых субъектов-добровольцев с уровнем LDL-C в начальный момент времени ≥ 100 мг/дл ($\geq 2,6$ ммоль/л) и уровнем триглицеридов натощак в начальный момент времени < 400 мг/дл ($< 4,5$ ммоль/л). В фазе MAD исследования субъекты с уровнем LDL-C > 100 мг/дл и уровнем триглицеридов натощак < 400 мг/дл ($< 4,5$ ммоль/л), принимающие стабильную дозу статина в течение > 30 дней до скрининга или не принимающие ее, получали многократные подкожные инъекции AD-60212, чтобы протестировать способность AD-60212 снижать уровни как белка PCSK9, так и LDL-C. Субъектам из группы исследования многократного введения вводили однократную фиксированную дозу AD-60212, составляющую 125 мг, один раз в неделю в течение четырех недель (125 мг qW шшш 4), или однократную фиксированную дозу AD-60212, составляющую 250 мг, один раз в две недели в течение одного месяца (250 мг q2W шшш 2), или однократную фиксированную дозу AD-60212, составляющую 300 мг, один раз в месяц в течение двух месяцев (300 мг qM шшш 2) без терапии статином, или однократную фиксированную дозу AD-60212, составляющую 300 мг, один раз в месяц в течение двух месяцев (300 мг qM шшш 2) с терапией статином, или однократную фиксированную дозу AD-60212, составляющую 500 мг, один раз в месяц в течение двух месяцев (500 мг qM шшш 2) без терапии статином, или однократную фиксированную дозу AD-60212, составляющую 500 мг, один раз в месяц в течение двух месяцев (500 мг qM шшш 2) с терапией статином.

Уровни белка PCSK9 в плазме крови определяли с помощью анализа ELISA, а уровни LDL-C в сыворотке крови определяли непосредственно с помощью количественного определения фф-холестерина (Medpace Reference Laboratories, Левен, Бельгия). Также определяли уровни общего холестерина, холестерина липопротеинов высокой плотности (HDL-C), холестерина, отличного от HDL-C (общий холестерин минус HDL-C), аполипопротеина B, липопротеина (a) и триглицерида.

Демографические данные когорты и характеристики в начальный момент времени у субъектов, участвующих в фазе SAD исследования, представлены в табл.2A, а демографические данные когорты и характеристики в начальный момент времени у субъектов, участвующих в фазе MAD, представлены в табл.2B.

Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей AD-60212 являются следующими:

смысловая нить - 5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3' (SEQ ID NO: 686) и
антисмысловая нить - 5'-ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA-3' (SEQ ID NO: 685).

Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей AD-60212 являются следующими:

смысловая нить - 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuugu-3' (SEQ ID NO: 687) и
антисмысловая нить - 5'-asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3' (SEQ ID NO: 688).

Фаза SAD.

AD-60212 хорошо переносился при всех уровнях дозы в фазе SAD, а также отсутствовало досроч-

ное завершение лечения из-за нежелательных явлений (АЕ) и не регистрировали серьезных АЕ.

Обусловленное нокдауном падение уровней белка PCSK9 в когорте однократной дозы, показанное в виде процента среднего обусловленного нокдауном падения PCSK9 относительно уровня в начальный момент времени, показано на фиг. 1, а снижение уровней LDL-C в когорте разовой дозы, показанное в виде процента среднего снижения уровня LDL-C относительно уровня в начальный момент времени, показано на фиг. 2, в табл.3 представлены среднее (SD) процентное изменение от уровня в начальный момент времени для уровня белка PCSK9, уровня LDL-C, уровня общего холестерина, уровня HDL-C, уровня холестерина, отличного от HDL-C, уровня аполипопротеина В, уровня триглицеридов и уровня аполипопротеина а в дни 84 и 180 после введения дозы в фазе SAD.

Эти данные демонстрируют, что при введении AD-60212 уровни PCSK9 снижались дозозависимым образом вплоть до дозы 300 мг. Дозы ≥ 300 мг обеспечивали аналогичные устойчивые снижения уровней PCSK9, которые сохранялись в течение периода, составляющего по меньшей мере 6 месяцев. Уровни PCSK9 возвращались к уровню в начальный момент времени (среднее значение трех последних измерений $\geq 80\%$ от уровня в начальный момент времени) ко дню 180 в когортах доз, составляющих 25 мг и 100 мг. У субъектов, получавших дозы ≥ 300 мг ($n=12$), максимальное индивидуальное относительное снижение уровней PCSK9 от уровня в начальный момент времени составляло 89% (доза 800 мг, день 112). Среднее максимальное процентное снижение (среднее процентное снижение, исходя из индивидуально-го максимального снижения) составляло 82% и наблюдалось в когорте дозы, составляющей 800 мг. Изменение уровней PCSK9 от уровня в начальный момент времени у субъектов, получавших ALN-PCSSc из расчета 300-800 мг ($n=2-6$ на группу дозы), было значимо выше, чем у субъектов, получавших плацебо ($P<0,011$), для всех 11 точек измерения от дня 7+1 после введения средства для лечения до дня 112 после введения средства для лечения.

Эти данные дополнительно демонстрируют, что введение AD-60212 приводило к снижению уровней LDL-C дозозависимым образом вплоть до дозы 300 мг, при которой достигалось почти максимальное снижение. Снижения уровней LDL-C были аналогичными в пределах диапазона доз, составляющих 300-800 мг. У субъектов, получавших эти дозы ($n=12$), максимальное индивидуальное снижение уровня LDL-C от уровня в начальный момент времени составляло 78% (доза 500 мг; день 56). Среднее максимальное процентное снижение и максимальное среднее процентное снижение, рассчитанное методом наименьших квадратов (LSM), составляли 59% и наблюдались в когортах дозы, составляющей 500 и 800 мг. Уровни LDL-C возвращались к уровням в начальный момент времени ко дню 180 после последнего введения доз, составляющих 25 мг и 100 мг. Снижение уровня LDL-C сохранялось по меньшей мере до дня 180 после введения доз ≥ 300 мг. Снижение уровня LDL-C от уровня в начальный момент времени у субъектов, получавших ALN-PCSSc из расчета 300-800 мг ($n=3-6$), было статистически значимым по сравнению с субъектами, получавшими плацебо ($P\leq 0,037$), для всех 10 определений от дня 4 \pm 2 после введения средства для лечения до дня 112 после введения средства для лечения.

Снижения концентраций общего холестерина, холестерина, отличного от HDL-C, аполипопротеина В и липопротеина (а) также отмечали у субъектов, получавших AD-60212. Снижения этих параметров были статистически значимыми по сравнению с плацебо при большинстве сравнений.

Фаза MAD.

AD-60212 также хорошо переносился при всех уровнях дозы в фазе MAD, а также отсутствовало досрочное завершение лечения из-за нежелательных явлений (АЕ) и не регистрировали серьезные АЕ.

Обусловленное нокдауном падение уровней белка PCSK9 в когорте многократной дозы, показанное в виде процента среднего обусловленного нокдауном падения PCSK9 относительно уровня в начальный момент времени, показано на фиг. 3, а снижение уровней LDL-C в когорте многократной дозы, показанное в виде процента среднего снижения уровня LDL-C относительно уровня в начальный момент времени, показано на фиг. 4, в табл.4 представлены среднее (SD) процентное изменение от уровня в начальный момент времени для уровня белка PCSK9, уровня LDL-C, уровня общего холестерина, уровня HDL-C, уровня холестерина, отличного от HDL-C, уровня аполипопротеина В, уровня триглицеридов и уровня аполипопротеина а в дни 84 и 180 после введения дозы в фазе SAD.

Эти данные демонстрируют, что уровни белка PCSK9 снижались после введения AD-60212 при всех исследуемых схемах лечения. Снижения были аналогичными среди всех когорт многократных доз, и при этом снижения сохранялись в течение по меньшей мере 6 месяцев после введения последней дозы. Что согласуется с опубликованной литературой (Khera AV, et al. (2015) *Am J Cardiol* 115:178-82; Guo YL, et al. (2013) *Clin Drug Investig* 33:877-83), значения уровня PCSK9 в начальный момент времени были выше у субъектов, получавших стабильные дозы статинов. Снижения уровней PCSK9 не зависели от уровней PCSK9 в начальный момент времени и были аналогичными у субъектов вне зависимости от терапии статином. Максимальное индивидуальное снижение уровня PCSK9 от уровня в начальный момент времени составляло 94% (500 мг QM \times 2 с совместным введением статина, день 63). Среднее максимальное процентное снижение составляло 89%, при этом оно наблюдалось у субъектов, получавших дозу 500 мг с совместной обработкой статином. Изменение концентраций PCSK9 от уровня в начальный момент времени у субъектов, получавших многократные дозы AD-60212 в качестве монотерапии (т. е. без введе-

ния статина; $n=3-6$ на группу дозы), было значимо выше, чем у субъектов, получавших плацебо ($P<0,002$), для всех 15 точек измерений от дня 4 после введения средства для лечения до дня 126 после введения средства для лечения.

Эти данные дополнительно демонстрируют, что аналогичное устойчивое снижение уровней LDL-C достигалось при всех схемах лечения с многократными дозами AD-60212. Снижение уровня LDL-C не зависело от уровней LDL-C в начальный момент времени и было аналогичным с совместной терапией статинами и без нее. Максимальное индивидуальное снижение уровня LDL-C составляло 83% (500 мг QM×2 с совместным введением статина, день 29). Среднее максимальное процентное снижение уровня LDL-C составляло 64%, при этом LSM-снижение, составляющее 60%, наблюдалось в когорте, получающей дозу, составляющую 300 мг, без приема статина. Снижение уровня LDL-C во всех когортах MD сохранялось в течение по меньшей мере 6 месяцев.

Изменение уровня LDL-C от уровня в начальный момент времени у субъектов, получавших монотерапию AD-60212 ($n=3-6$), значимо отличалось от субъектов, получавших плацебо ($P\leq 0,05$), в течение периодов в диапазоне от ~8 до ~17 недель, в зависимости от схемы лечения.

Снижения концентраций общего холестерина, холестерина, отличного от HDL-C, аполипопротеина В и липопротеина (а) также отмечали у субъектов, которых лечили с помощью ALN-PCSSc. Снижения этих параметров были статистически значимыми по сравнению с плацебо при большинстве сравнений.

Подводя итог, подкожное введение AD-60212, нацеливающегося на PCSK9, с целью снижения уровней LDL-C хорошо переносилось при однократных дозах, составляющих 25-800 мг, и при схемах MD с 2-4 дозами, составляющими в общей сложности 500-1000 мг, в течение 28-дневного периода.

Как показано на фиг. 1 и 2 и в табл.3, однократная подкожная инъекция фиксированной дозы (≥ 300 мг AD-60212) приводила к длительному обусловленному нокдауном падению PCSK9 и снижению уровня LDL-C в течение более 6 месяцев после введения однократной дозы. Максимальное обусловленное нокдауном падение PCSK9 составляло вплоть до 89%, при этом среднее максимальное снижение уровня PCSK9 составляло 82%, а максимальное снижение уровня LDL-C составляло вплоть до 78%, при этом среднее максимальное снижение уровня LDL-C составляло 59% после введения однократной фиксированной дозы AD-60212. Кроме того, уровень LDL-C значимо ($P<0,001$) снижался в среднем на 44% ко дню 140 после введения однократной дозы.

Как показано на фиг. 3 и 4 и в табл.4, две ежемесячные фиксированные дозы AD-60212 приводили к максимальному обусловленному нокдауном падению PCSK9 вплоть до 94%, при этом среднее максимальное снижение уровня PCSK9 составляло 89%, и максимальному снижению уровня LDL-C вплоть до 83%, при этом среднее максимальное снижение уровня LDL-C составляло 64%, при сопутствующем введении статина или без него.

Эти данные демонстрируют, что однократные дозы AD-60212 (≥ 300 мг) и все многократные дозы, показанные в данном документе, были ассоциированы с высокоустойчивым снижением циркулирующих концентраций как PCSK9, так и LDL-C. Эффект этих доз в отношении уровней PCSK9 и LDL-C был таким, что они оставались значимо сниженными в течение по меньшей мере 180 дней после введения средства для лечения, так что снижения уровней PCSK9 вплоть до 76% и снижения уровней LDL-C вплоть до 48% все еще наблюдались через 6 месяцев после последней инъекции AD-60212, и при этом было продемонстрировано весьма небольшая изменчивость в течение 6-месячного периода после введения дозы. Аддитивное снижение уровня LDL-C в сыворотке крови достигалось в случае добавления AD-60212 к терапии статином, и при этом комбинированная терапия оказывала воздействия на безопасность и переносимость каждого средства.

В обеих фазах SAD и MAD снижения концентраций общего холестерина, холестерина, отличного от HDL-C, аполипопротеина В и липопротеина (а) отмечали у субъектов, получавших AD-60212. Снижения этих параметров были статистически значимыми по сравнению с плацебо при большинстве сравнений.

Таблица 2А. Демографические данные и характеристики в начальный момент времени для когорты SAD

	Фаза однократных нарастающих доз							Плацебо	
	ALN-PCSSc							Со статином (n=4)	Без статины (n=8)
	Плацебо (n=6)	25 мг (n=3)	100 мг (n=3)	300 мг (n=3)	500 мг (n=3)	800 мг (n=6)	Всего (n=24)		
Возраст, лет; среднее (SD)	48 (14,2)	47 (14,2)	48 (6,2)	48 (12,7)	39 (14,0)	49 (6,7)	47 (10,7)	58 (3,0)	51 (14,2)
Пол, n (%)									
Мужчины	2 (33,3%)	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	5 (83,3%)	19 (79,2%)	2 (50,0%)	6 (75,0%)
Раса, n (%)									
Белые	4 (66,7%)	2 (66,7%)	3 (100%)	1 (33,3%)	3 (100%)	3 (50,0%)	16 (66,7%)	4 (100%)	7 (87,5%)
Черные или афроамериканцы	2 (33,3%)	1 (33,3%)	0	1 (33,3%)	0	0	4 (16,7%)	0	0
Азиаты	0	0	0	1 (33,3%)	0	1 (16,7%)	2 (8,3%)	0	0
Другие	0	0	0	0	0	2 (33,3%)	2 (8,3%)	0	1 (12,5%)
Вес тела, кг; среднее (SD)	70,6 (12,04)	84,5 (2,11)	77,3 (6,66)	81,2 (11,04)	71,6 (7,93)	74,0 (6,01)	75,5 (9,16)	74,3 (5,07)	77,6 (10,31)
Рост, см; среднее (SD)	168 (10,6)	175 (2,3)	174 (5,1)	173 (9,6)	175 (3,1)	169 (5,5)	172 (7,2)	168 (10,5)	171 (9,3)
BMI, кг/м ² ; среднее (SD)	24,9 (3,17)	27,7 (0,21)	25,5 (2,10)	27,0 (1,29)	23,4 (3,01)	25,9 (1,60)	25,6 (2,39)	26,5 (2,72)	26,7 (2,64)
Уровень LDL-C, ммоль/л; среднее (SD)	3,4 (0,50)	4,6 (1,31)	3,9 (0,92)	4,2 (0,95)	3,1 (0,44)	4,1 (0,74)	3,8 (0,85)	3,7 (2,32)	3,4 (0,54)
Уровень TG, ммоль/л; среднее (SD)	0,8 (0,14)	1,3 (0,67)	2,0 (1,16)	1,5 (0,55)	1,8 (0,95)	1,3 (0,24)	1,4 (0,65)	1,7 (0,53)	1,4 (0,43)
Уровень PCSK9, мкг/л; среднее (SD)	278,95 (99,53)	342,65 (67,89)	233,77 (39,17)	253,82 (22,36)	263,23 (24,98)	279,62 (66,90)	276,32 (68,28)	460,69 (56,295)	276,23 (58,69)

BMI = индекс массы тела; LDL-C=холестерин липопротеинов низкой плотности; PCSK9 = пропротеинконвертаза субтилизин/кексинового типа 9; QMx2 = 2 ежемесячные дозы; QWx4 = 4 еженедельные дозы; Q2Wx2 = 2 дозы раз в две недели; SD = стандартное отклонение; TG = триглицериды.

Для перевода значений холестерина в мг/дл умножить на 38,67. Для перевода значений TG в мг/дл умножить на 88,57.

Таблица 2В. Демографические данные и характеристики в начальный момент времени для когорты MAD

	Фаза многократных доз								Всего (n=45)
	Плацебо		ALN-PCSSc						
	Со статином (n=4)	Без статины (n=8)	300 мг QMx2 Со статином (n=4)	300 мг QMx2 Без статины (n=6)	500 мг QMx2 Со статином (n=5)	500 мг QMx2 Без статины (n=6)	125 мг QWx4 Без статины (n=6)	250 мг Q2Wx2 Без статины (n=6)	
Возраст, лет; среднее (SD)	58 (3,0)	51 (14,2)	52 (21,6)	47 (8,7)	56 (11,5)	42 (16,1)	55 (9,4)	61 (6,3)	52 (12,7)
Пол, n (%)									
Мужчины	2 (50,0%)	6 (75,0%)	2 (50,0%)	6 (100%)	2 (40,0%)	3 (50,0%)	4 (66,7%)	4 (66,7%)	29 (64,4%)
Раса, n (%)									
Белые	4 (100%)	7 (87,5%)	3 (75,0%)	6 (100%)	3 (60,0%)	5 (83,3%)	5 (83,3%)	3 (50,0%)	36 (80,0%)
Черные или афроамериканцы	0	0	0	0	1 (20,0%)	0	0	1 (16,7%)	2 (4,4%)
Азиаты	0	0	1 (25,0%)	0	1 (20,0%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	0	4 (8,9%)
Другие	0	1 (12,5%)	0	0	0	0	0	2 (33,3%)	3 (6,7%)
Вес тела, кг; среднее (SD)	74,3 (5,07)	77,6 (10,31)	85,0 (22,04)	77,8 (15,19)	71,9 (11,03)	64,9 (7,86)	73,1 (7,07)	83,2 (8,12)	75,8 (12,03)
Рост, см; среднее (SD)	168 (10,5)	171 (9,3)	176 (12,5)	175 (7,4)	167 (11,7)	168 (5,3)	167 (6,9)	176 (10,1)	171 (9,2)

(SD)									
ВМІ, кг/м ² ; среднее (SD)	26,5 (2,72)	26,7 (2,64)	27,1 (3,59)	25,2 (2,95)	25,7 (1,97)	23,0 (2,34)	26,2 (2,72)	27,0 (1,93)	25,9 (2,72)
Уровень LDL-C, ммоль/л; среднее (SD)	3,7 (2,32)	3,4 (0,54)	3,7 (0,79)	3,7 (0,52)	2,7 (0,51)	3,2 (1,29)	3,6 (0,48)	3,8 (0,37)	3,5 (0,92)
Уровень TG, ммоль/л; среднее (SD)	1,7 (0,53)	1,4 (0,43)	1,5 (0,98)	1,5 (1,02)	1,1 (0,50)	1,0 (0,23)	1,0 (0,29)	1,8 (0,78)	1,4 (0,66)
Уровень PCSK9, мкг/л; среднее (SD)	460,69 (56,295)	276,23 (58,69)	460,69 (209,435)	311,47 (59,85)	433,44 (107,28)	288,07 (69,07)	380,03 (50,63)	288,73 (53,53)	348,34 (103,99)

ВМІ = индекс массы тела; LDL-C = холестерин липопротеинов низкой плотности; PCSK9 = пропротеинконвертаза субтилизин/кексинового типа 9; QM×2 = 2 ежемесячные дозы; QW×4 = 4 еженедельные дозы; Q2W×2 = 2 дозы раз в две недели; 30 = стандартное отклонение; Т6 = триглицериды.

Для перевода значений холестерина в мг/дл умножить на 38,67. Для перевода значений TG в мг/дл умножить на 88,57.

Таблица 3. Среднее (SD) процентное изменение фармакодинамических параметров от уровня в начальный момент времени в фазе SAD (популяция для оценки фармакодинамики)						
	Плацебо (n=6)	ALN-PCSK9				
		25 мг (n=3)	100 мг (n=3)	300 мг (n=3)	500 мг (n=3)	800 мг (n=6)
PCSK9						
День 84						
n	5	2	3	3	3	6
Среднее (SD) процентное изменение	-0,1 (14,3)	-47,3 (7,2)	-29,9 (12,9)	-72,6 (12,1)	-68,7 (9,8)	-72,2 (8,5)
День 180						
n	NA	NA	2	3	2	4
Среднее (SD) процентное изменение	NA	NA	-15,7 (0,2)	-47,8 (24,8)	-70,3 (6,6)	-74,3 (13,2)
Среднее (SD) процентное изменение, исходя из индивидуального максимального снижения ^a	-29,4 (9,53)	-54,3 (4,75)	-48,9 (27,37)	-77,9 (3,49)	-75,7 (11,75)	-82,3 (4,85)
Среднее (SD) процентное изменение, исходя из группового максимального снижения ^b	-17,5 (19,56)	-51,2 (0,56)	-41,7 (21,28)	-74,0 (0,57)	-77,7 (1,28)	-79,4 (3,27)
Время до достижения группового максимального снижения, дни	35	42	42	42	112	98
LDL-C						
День 84						
n	5	2	3	3	3	5
Среднее (SD) процентное изменение	-7,5 (15,6)	-27,9 (11,4)	-36,6 (6,1)	-48,4 (19,0)	-47,6 (15,2)	-41,9 (12,3)
День 180						
n	NA	NA	2	3	2	4
Среднее (SD) процентное изменение	NA	NA	-26,3 (2,1)	-47,8 (0,5)	-37,9 (21,7)	-35,2 (16,8)
Среднее (SD) процентное изменение, исходя из индивидуального максимального снижения ^a	-18,7 (5,61)	-34,5 (8,62)	-42,9 (15,35)	-55,0 (10,03)	-55,1 (19,93)	-59,2 (12,25)
Среднее (SD) процентное изменение, исходя из группового максимального снижения ^b	-8,6 (18,07)	-27,9 (11,43)	-38,7 (2,07)	-48,4 (18,99)	-55,1 (24,46)	-51,8 (8,44)
Время до достижения группового максимального снижения, дни	98	84	140	84	98	35
Общий холестерин						
День 84						
n	5	2	3	3	3	5
Среднее (SD) процентное изменение	-1,3 (11,7)	-20,2 (9,4)	-18,2 (10,7)	-30,9 (9,4)	-24,2 (10,2)	-28,1 (11,7)
День 180						
n	NA	NA	2	3	2	4
Среднее (SD) процентное изменение	NA	NA	-14,1 (2,9)	-30,5 (5,7)	-23,5 (11,1)	-25,0 (12,2)
HDL-C						
День 84						
n	5	2	3	3	3	5
Среднее (SD) процентное изменение	11,7 (14,4)	8,3 (10,3)	19,6 (17,7)	50,5 (71,3)	6,5 (6,4)	1,9 (17,0)
День 180						
n	NA	NA	2	3	2	4
Среднее (SD) процентное изменение	NA	NA	18,1 (26,3)	12,8 (42,5)	-2,8 (2,8)	-0,2 (16,4)
Холестерин, отличный от HDL-C						
День 84						
n	5	2	3	3	3	5
Среднее (SD) процентное изменение	-6,6 (12,2)	-25,5 (11,3)	-28,8 (7,5)	-47,2 (19,2)	-34,1 (12,6)	-36,0 (12,6)
День 180						
n	NA	NA	2	3	2	4
Среднее (SD) процентное изменение	NA	NA	-21,2 (3,6)	-38,0 (12,6)	-29,5 (13,6)	-30,4 (13,4)
Аполипопротеин В						
День 84						
n	5	2	3	3	3	5
Среднее (SD) процентное изменение	-10,0 (15,6)	-18,2 (9,7)	-28,1 (15,6)	-45,5 (20,5)	-36,0 (11,7)	-44,5 (11,8)
День 180						
n	NA	NA	2	3	2	4
Среднее (SD) процентное изменение	NA	NA	-30,5 (7,6)	-37,6 (12,2)	-29,2 (18,8)	-27,7 (13,6)
Триглицериды						
День 84						
n	5	2	3	3	3	5
Среднее (SD) процентное изменение	-12,4 (7,9)	-9,0 (19,7)	-9,6 (20,2)	-25,1 (29,2)	15,1 (28,1)	24,6 (48,2)
День 180						
n	NA	NA	2	3	2	4
Среднее (SD) процентное изменение	NA	NA	-18,7 (35,5)	45,0 (105,8)	-8,6 (10,1)	-7,4 (23,2)
Липопротеин (а)						
День 84						
n	5	2	3	3	3	5
Среднее (SD) процентное изменение	6,7 (25,7)	-2,8 (29,0)	-20,1 (3,5)	-33,8 (46,7)	-30,4 (27,0)	-22,1 (20,8)
День 180						
n	NA	NA	2	3	2	4
Среднее (SD) процентное изменение	NA	NA	6,6 (23,7)	-37,9 (35,8)	-31,1 (26,7)	-2,5 (18,9)

HDL-C = холестерин липопротеинов высокой плотности; LDL-C = холестерин липопротеинов низкой плотности; NA = не применимо; PCSK9 = пропротеинконвертаза субтилизин/кексинового типа 9;

SD=стандартное отклонение.

^a Значения индивидуального максимального снижения определены как наибольшее процентное изменение после введения дозы от значения в начальный момент времени для субъекта. Эти значения затем обобщают.

^b Групповое максимальное снижение определяется как наибольшее среднее процентного изменение от значения в начальный момент времени после введения дозы в ходе исследования.

Таблица 4. Среднее (SD) процентное изменение фармакодинамических параметров от уровня в начальный момент времени в фазе MAD (популяция для оценки фармакодинамики)								
	Плацебо		ALN-PCSc					
	Со статином (n=3)	Без статина (n=8)	300 мг QMx2 Со статином (n=3)	300 мг QMx2 Без статина (n=6)	500 мг QMx2 Со статином (n=5)	500 мг QMx2 Без статина (n=6)	125 мг QWx4 Без статина (n=6)	250 мг Q2Wx2 Без статина (n=6)
PCSK9								
84 дней после введения последней дозы								
n	3	6	3	6	5	6	6	6
Среднее (SD) процентное изменение	-0,5 (33,4)	1,3 (36,7)	-78,1 (3,9)	-70,6 (10,9)	-82,6 (9,5)	-74,2 (8,3)	-75,0 (7,5)	0 (6,8)
180 дней после введения последней дозы								
n	NA	NA	1	6	4	6	6	6
Среднее (SD) процентное изменение	NA	NA	-69,7 (NC)	-62,6 (10,7)	-75,9 (10,8)	-72,3 (14,3)	-63,3 (14,5)	4 (9,9)
Среднее (SD) процентное изменение, исходя из индивидуального максимального снижения ^b	-42,4 (3,76)	-25,3 (20,51)	-86,1 (2,06)	-80,4 (4,92)	-88,5 (3,67)	-81,5 (5,73)	-83,8 (2,13)	-82,7 (2,81)
Среднее (SD) процентное изменение, исходя из группового максимального снижения ^b	-21,2 (8,9)	-6,1 (NC)	-83,6 (4,06)	-73,1 (6,31)	-85,2 (1,83)	-79,9 (5,35)	-80,3 (4,73)	-79,4 (3,83)
Время до достижения группового максимального снижения, дни	28	91	56	56	84	84	77	35
LDL-C								
84 дней после введения последней дозы								
n	3	5	3	6	5	6	6	6
Среднее (SD) процентное изменение	0,9 (33,3)	-7,0 (11,6)	-44,7 (21,2)	-48,8 (9,0)	-38,9 (13,6)	-48,5 (14,2)	-41,8 (8,8)	-50,0 (10,5)
180 дней после введения последней дозы								
n	NA	NA	1	6	4	6	6	6
Среднее (SD) процентное изменение	NA	NA	-30,0 (NC)	-44,3 (12,8)	-44,2 (26,2)	-45,3 (16,1)	-34,5 (5,8)	-42,1 (16,6)
Среднее (SD) процентное изменение, исходя из индивидуального	-27,7 (13,19)	-19,2 (9,68)	-53,8 (19,78)	-64,4 (13,22)	-59,9 (18,14)	-56,2 (14,59)	-52,1 (4,75)	-60,4 (11,02)

максимального снижения ^а									
Среднее (SD) процентное изменение, исходя из группового максимального снижения ^б	-18,4 (17,7)	-16,3 (NC)	-46,7 (18,29)	-55,7 (13,20)	-48,9 (23,77)	-51,9 (14,97)	-44,8 (4,07)	-54,8 (7,77)	
Время до достижения группового максимального снижения, дни	35	105	70	70	140	140	63	49	
Общий холестерин									
84 дней после введения последней дозы	2,9 (25,1)	-11,8 (11,3)	-24,2 (13,4)	-39,9 (7,4)	-28,6 (16,1)	-25,8 (9,3)	-25,9 (5,4)	-32,0 (7,4)	
180 дней после введения последней дозы	NA	NA	-13,9 (NA)	-26,0 (6,5)	-25,0 (19,6)	-24,2 (12,8)	-22,2 (4,7)	-26,4 (13,9)	
HDL-C									
84 дней после введения последней дозы	10,6 (11,8)	-2,1 (15,1)	11,2 (9,4)	13,5 (15,6)	5,2 (15,9)	13,1 (15,9)	7,3 (3,9)	7,0 (15,8)	
180 дней после введения последней дозы	NA	NA	20,5 (NA)	7,5 (7,7)	3,8 (10,6)	6,0 (12,7)	3,5 (6,5)	10,2 (11,0)	
Холестерин, отличный от HDL-C									
84 дней после введения последней дозы	1,3 (36,5)	-15,1 (11,2)	-35,2 (10,7)	-55,3 (12,7)	-43,4 (19,1)	-43,6 (11,8)	-37,4 (9,6)	-42,5 (9,2)	
	NA	NA	-25,5 (NA)	-35,5 (8,0)	-36,4 (22,0)	-37,7 (15,4)	-31,1 (4,9)	-36,6 (16,3)	
Аполипопротеин В									
84 дней после введения последней дозы	-6,1 (31,7)	-15,3 (11,0)	-36,8 (9,7)	-51,5 (10,7)	-40,1 (14,0)	-45,3 (11,9)	-36,4 (10,1)	-42,7 (9,9)	
180 дней после введения последней дозы	NA	NA	-24,1 (NA)	-35,1 (10,1)	-34,9 (21,3)	-37,4 (14,8)	-24,4 (3,1)	-36,5 (15,7)	
Триглицериды									
84 дней после введения последней дозы	1,5 (45,7)	-8,1 (33,8)	-8,8 (6,5)	-39,3 (13,8)	-16,6 (15,2)	-0,1 (24,5)	-7,5 (19,0)	-18,0 (12,0)	
180 дней после введения последней дозы	NA	NA	-13,1 (NA)	7,4 (37,3)	7,2 (23,1)	6,1 (15,8)	-0,7 (28,9)	21,3 (48,7)	
Липопротеин (а)									
84 дней после введения последней дозы	3,2 (20,9)	-14,7 (18,6)	-17,9 (42,5)	-19,4 (24,9)	-28,9 (28,0)	-27,6 (15,6)	-27,4 (8,9)	-25,3 (12,9)	
180 дней после введения последней дозы	NA	NA	-12,2 (NA)	-15,9 (26,6)	-23,7 (26,4)	-27,7 (23,7)	-29,0 (15,3)	-28,9 (12,6)	

HDL-C = холестерин липопротеинов высокой плотности; LDL-C = холестерин липопротеинов низкой плотности; NA = не применимо; NC = не рассчитывали; PCSK9 = пропротеинконвертаза субтилизин/кексинового типа 9; QM×2 = 2 ежемесячные дозы; QW×4 = 4 еженедельные дозы; Q2W×2 = 2 дозы раз в две недели; SD=стандартное отклонение.

^а Значения индивидуального максимального снижения определены как наибольшее процентное изменение после введения дозы от значения в начальный момент времени для субъекта. Эти значения затем обобщают.

^б Групповое максимальное снижение определяется как наибольшее среднее процентного изменение от значения в начальный момент времени после введения дозы в ходе исследования.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения гиперлипидемии у субъекта-человека, имеющего гиперлипидемию, предусматривающий подкожное введение субъекту-человеку фиксированной дозы, составляющей от приблизи-

тельно 275 мг до приблизительно 325 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) или его соли,

где двухнитевое RNAi-средство содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuuugu-3' (SEQ ID NO: 687), и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-asCfsaAfaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3' (SEQ ID NO: 688),

где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-ОМе) А, G, С и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют 2'-фтор-модифицированные А, G, С и U, соответственно; dT представляет собой 2'-дезокситимидин; и s представляет собой фосфотиоатную связь, и

средство на основе двухнитевой RNAi конъюгировано с лигандом N-ацетилгалактозамином (GalNAc)₃,

где фиксированная доза вводится субъекту один раз в три месяца или один раз в шесть месяцев.

2. Способ ингибирования экспрессии гена пропротеинконвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9) у человека, предусматривающий подкожное введение субъекту-человеку фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 275 мг до приблизительно 325 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) или его соли,

где средство на основании двухнитевой RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuuugu-3' (SEQ ID NO: 687), и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-asCfsaAfaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3' (SEQ ID NO: 688),

где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-ОМе) А, G, С и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют 2'-фтор-модифицированные А, G, С и U, соответственно; dT представляет собой 2'-дезокситимидин; и s представляет собой фосфотиоатную связь, и

средство на основе двухнитевой RNAi конъюгировано с лигандом N-ацетилгалактозамином (GalNAc)₃,

где фиксированная доза вводится человеку с интервалом один раз в три месяца или один раз в шесть месяцев.

3. Способ снижения уровня холестерина липопротеина низкой плотности (LDLc) в сыворотке человека-субъекта, предусматривающий подкожное введение субъекту-человеку фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 275 мг до приблизительно 325 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) или его соли,

где средство на основании двухнитевой RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuuugu-3' (SEQ ID NO: 687), и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-asCfsaAfaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3' (SEQ ID NO: 688),

где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-ОМе) А, G, С и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют 2'-фтор-модифицированные А, G, С и U, соответственно; dT представляет собой 2'-дезокситимидин; и s представляет собой фосфотиоатную связь, и

средство на основе двухнитевой RNAi конъюгировано с лигандом N-ацетилгалактозамином (GalNAc)₃,

где фиксированная доза вводится человеку один раз в три месяца или один раз в шесть месяцев.

4. Способ снижения уровня холестерина липопротеина низкой плотности (LDLc) в сыворотке человека-субъекта, имеющего один или более факторов риска, связанных с сердечно-сосудистым заболеванием, при этом способ предусматривает подкожное введение субъекту-человеку фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 275 мг до приблизительно 325 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) или его соли,

где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuuugu-3' (SEQ ID NO: 687), и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-asCfsaAfaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3' (SEQ ID NO: 688),

где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-ОМе) А, G, С и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют 2'-фтор-модифицированные А, G, С и U, соответственно; dT представляет собой 2'-дезокситимидин; и s представляет собой фосфотиоатную связь, и

средство на основе двухнитевой RNAi конъюгировано с лигандом N-ацетилгалактозамином (GalNAc)₃,

где фиксированная доза вводится человеку один раз в три месяца или один раз в шесть месяцев

5. Способ по любому из пп.1-4, где субъекту вводят фиксированную дозу приблизительно 300 мг.

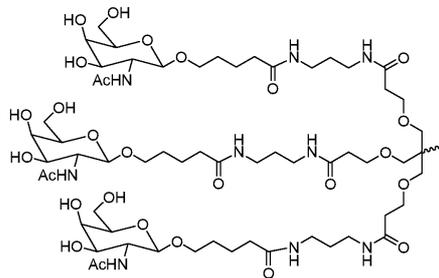
6. Способ по любому из пп.1-5, где субъекту вводят фиксированную дозу приблизительно 300 мг один раз в три месяца.

7. Способ по любому из пп.1-5, где человеку вводят фиксированную дозу приблизительно 300 мг

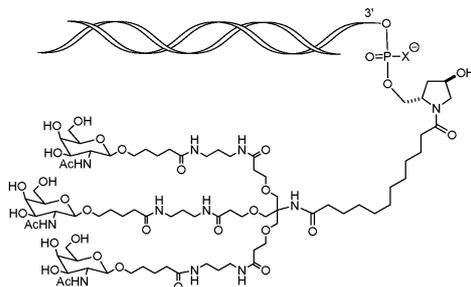
один раз в шесть месяцев.

8. Способ по любому из пп.1-7, где лиганд (GalNAc)₃ конъюгирован с 3'-концом смысловой нити двунитевого RNAi-средства.

9. Способ по п.8, где лиганд (GalNAc)₃ представляет собой



10. Способ по п.9, где двунитевое RNAi-средство конъюгировано с лигандом (GalNAc)₃, как показано на следующей схеме

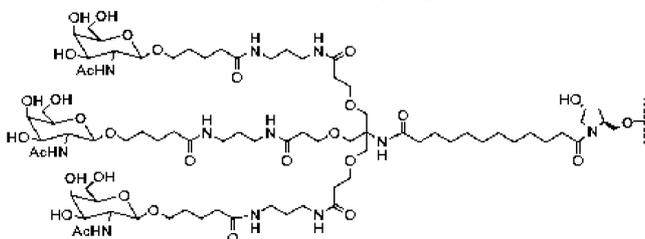


и где X представляет собой O или S.

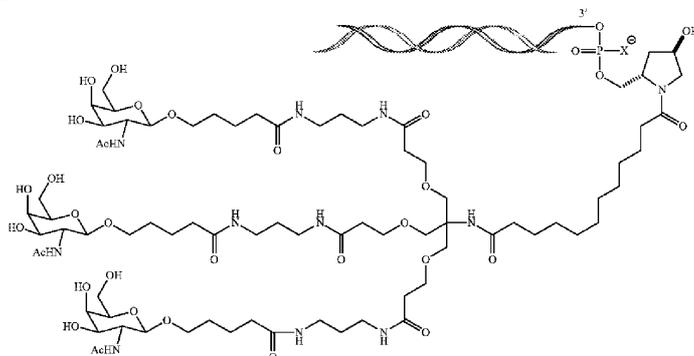
11. Способ по п.10, где X представляет собой O.

12. Способ по любому из пп.1-11, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-csusagacCfuGfudTuugcuiuuuguL96-3' (SEQ ID NO: 687), и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3' (SEQ ID NO: 688),

где a, g, c и u представляют собой 2'-O-метил-модифицированные (2'-OMe) A, G, C и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, G, C и U, соответственно; dT представляет собой 2'-дезокситимидин; s представляет собой фосфотиоатную связь и L96 представляет собой



где L96 конъюгирован с 3'-концом смысловой нити как показано на следующей схеме:



где X представляет собой O.

13. Способ по любому из пп.1-12, где двунитевое RNAi-средство находится в форме соли.

14. Способ по любому из пп.1-13, где подкожное введение представляет собой подкожную инъекцию.

15. Способ по любому из пп.1-14, где двунитевое RNAi-средство или его соль вводят в фармацевтической композиции.

16. Способ по п.15, где фармацевтическая композиция содержит двунитевое RNAi-средство или его

соль в незабуференном растворе.

17. Способ по п.16, где незабуференный раствор представляет собой солевой раствор или воду.

18. Способ по п.15, где фармацевтическая композиция содержит двунитовое RNAi-средство или его соль в буферном растворе.

19. Способ по п.18, где буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию.

20. Способ по п.18, где буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буфер (PBS).

21. Способ по любому из пп.1-20, дополнительно предусматривающий введение дополнительного терапевтического средства для лечения нарушения липидного обмена субъекту.

22. Способ по п.21, где дополнительное терапевтическое средство представляет собой статин.

23. Способ по п.21, где дополнительное терапевтическое средство представляет собой антитело к PCSK9.

24. Способ по п.23, где антитело к PCSK9 выбрано из группы, состоящей из алирокумаба (Praluent), эволокумаба (Repatha) и бокоцизумаба.

25. Способ по п.1, где гиперлипидемия представляет собой гиперхолестеринемия.

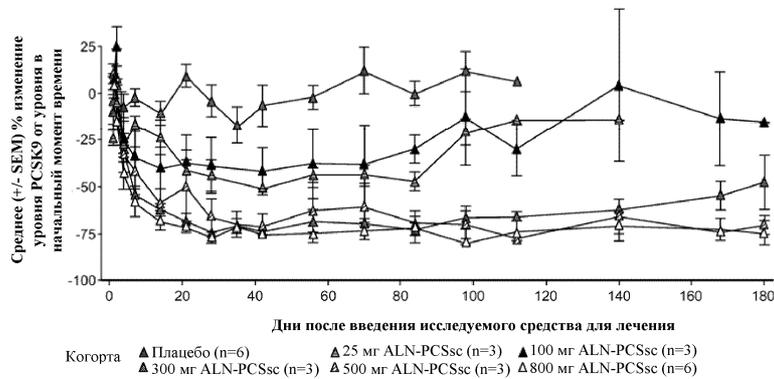
26. Способ по любому из пп.1, 2 и 5-25, где введение двунитового RNAi-средства субъекту снижает уровень холестерина липопротеина низкой плотности (LDLc) у субъекта.

27. Способ по любому из пп.1-24, где субъект имеет гиперхолестеринемия.

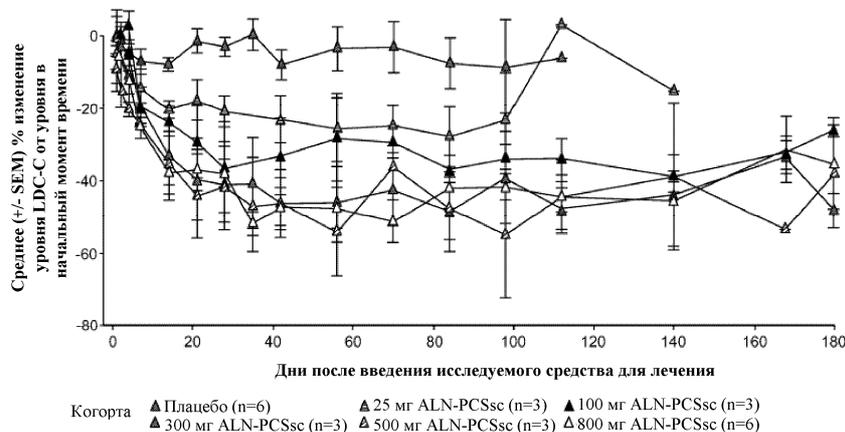
28. Способ по любому из пп.1-27, где субъект имеет гетерозиготный по рецептору LDL(LDLR) генотип.

29. Способ по любому из пп.1-28, где субъект-человек имеет один или более факторов риска, связанных с сердечно-сосудистым заболеванием, которое выбрано из группы, состоящей из атеросклероза, заболевания коронарных артерий, заболевания клапанов сердца, аритмии, сердечной недостаточности, гипертонии, ортостатической гипотензии, шока, эндокардита, заболевания аорты и ее ветвей, нарушения периферической сосудистой системы, сердечного приступа, кардиомиопатии и врожденного порока сердца.

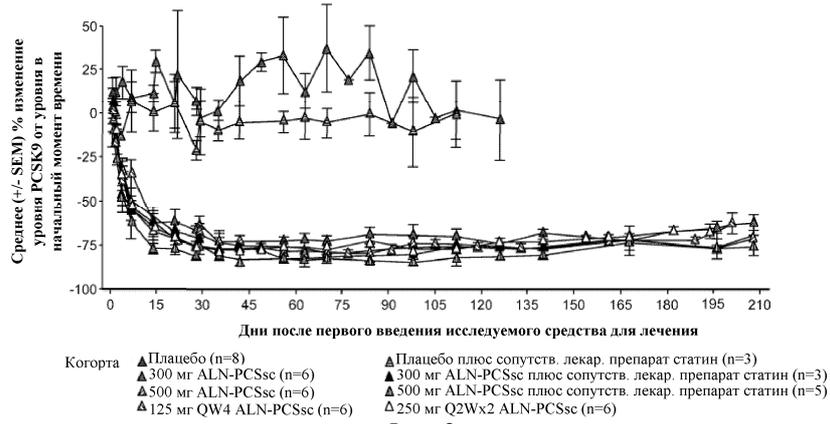
30. Способ по п.4, где один или более факторов риска, связанных с сердечно-сосудистым заболеванием, выбирают из группы, состоящей из диабета, предыдущего случая ишемической болезни сердца (CHD) или некоронарного атеросклероза в анамнезе, случая сердечно-сосудистого заболевания в семейном анамнезе, потребления табака, гипертонии и ожирения.



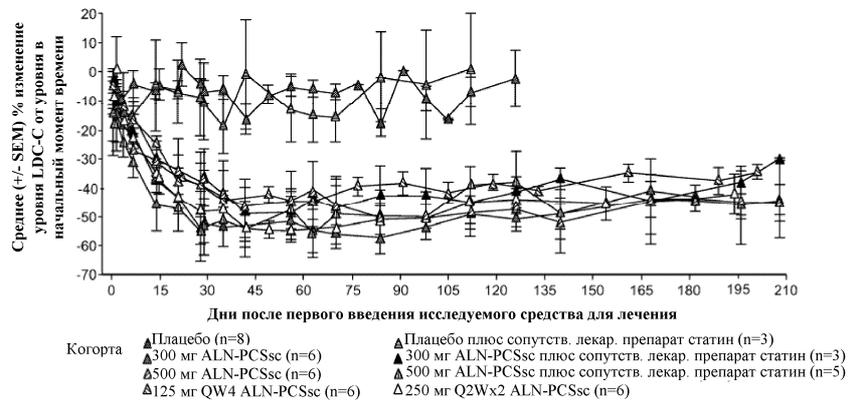
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

