

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041697**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.23

(21) Номер заявки
201792103

(22) Дата подачи заявки
2016.05.27

(51) Int. Cl. *A61K 31/713* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ
HIF2АЛЬФА**

(31) **62/168,244**

(32) **2015.05.29**

(33) **US**

(43) **2018.06.29**

(86) **PCT/US2016/034512**

(87) **WO 2016/196239 2016.12.08**

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

(72) Изобретатель:
**Вон Со, Льюис Дэвид Л., Розема
Дэвид Б., Вэйкфилд Даррен Х.,
Чэн Вэйцзюнь, Альмейда Лорен
Дж., Блохин Андрей В., Карлсон
Джеффри С., Николас Энтони Л.,
Альмейда Аарон, Каннер Стивен Б.,
Бенсон Джонатан Д., Вудс Джастин
(US)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) US-A1-20100010071
US-B2-8741868
WO-A2-2014134255
US-A1-20040204377
BERTOUT et al.: "Hif2 α inhibition promotes
p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation
responses", Proceedings of the National Academy of
Sciences, 25 August 2009 (25.08.2009), vol. 106, №
34, pgs. 14391-14396, entire document

(57) Описаны триггеры РНК-интерференции (РНКи) и конъюгаты РНКи-триггеров для ингибирования экспрессии гена Hif2 α (EPAS1). Также описаны фармацевтические композиции, содержащие один или более РНКи-триггеров Hif2 α необязательно с одним или более дополнительными терапевтическими средствами. Доставка описанных РНКи-триггеров Hif2 α в опухолевые клетки in vivo обеспечивает ингибирование экспрессии генов Hif2 α и лечение рака.

B1

041697

041697

B1

Уровень техники

EPAS1 является членом семейства генов HIF (hypoxia inducible factor, фактор, индуцируемый гипоксией). Также известный как Hif2альфа или Hif2 α , EPAS1 кодирует половину фактора транскрипции, который вовлечен в индукцию генов, регулируемых кислородом, и который индуцируется, когда уровни кислорода снижаются (состояние, известное как гипоксия).

Определенные варианты этого гена обеспечивают защиту людям, живущим в высокогорье. Однако на низкой высоте над уровнем моря сверхэкспрессия EPAS1 дикого типа (ДТ) связана с увеличением риска гипертензии и инсульта и с симптомами, аналогичными высокогорной болезни. Мутации в данном гене связаны с наследственным эритроцитозом 4 типа и легочной гипертензией. EPAS1 может вызывать чрезмерное образование красных кровяных клеток, которое приводит к ингибированию репродуктивной способности или даже к смерти.

Было показано, что EPAS1 необходим для экспрессии различных генов или для усиления экспрессии различных генов, вовлеченных во множество заболеваний, включая прогрессирование опухоли. Например, EPAS1, возможно, играет некоторую роль в прогрессировании увеальных меланом, возможно, путем стимуляции аутокринной петли VEGF-pVEGFR2/KDR и путем усиления экспрессии LDHA, тем самым благоприятствуя их росту.

Также было показано, что EPAS1 вовлечен в экспрессию других факторов или активирует экспрессию других факторов, включая

cMyc (который способствует пролиферации клеток, трансформации, неоплазии и опухолегенезу и который на высоком уровне экспрессируется в большинстве вариантов рака);

интерлейкин 8 (провоспалительный медиатор, например, при гингивите и псориазе);

SP-1 (фактор транскрипции, вовлеченный в регуляцию ИЛ-8, и коактиватор cMyc);

LDH5 (который связан с некрозом опухоли и увеличением размеров опухоли); и

LANA (Latency Associated Nuclear Antigen, ассоциированный с латентностью ядерный антиген, который связан с герпесвирусом, ассоциированным с саркомой Капоши).

Кроме того, активность HIF (фактора, индуцируемого гипоксией), возможно, играет некоторую роль при ангиогенезе, который необходим для роста раковой опухоли. EPAS1 может также быть вовлечен в некоторые другие заболевания, включая воспаление, хроническое воспаление, неоваскулярное заболевание, ревматоидный артрит, рак почки, светлоклеточную почечно-клеточную карциному (и метастазы данного и других вариантов рака), меланому, увеальную меланому, хондросаркому и множественную миелому.

Мутации в гене EPAS1 коррелировали с ранней манифестацией нейроэндокринных опухолей, таких как параганглиомы, соматостатиномы и/или феохромоцитомы. Мутации, как правило, являются соматическими миссенс-мутациями, расположенными в первичном сайте гидроксирования HIF-2 α . Предполагают, что данные мутации, нарушают механизм гидроксирования/расщепления белка и приводят к стабилизации белка и псевдогипоксической передаче сигналов. Кроме того, нейроэндокринные опухоли высвобождают эритропоэтин (ЕРО) в циркулирующую кровь и приводят к полицитемии.

Краткое описание

В настоящей заявке описаны триггерные молекулы РНК-интерференции (РНКи) (также называемые РНКи-агента, РНКи-триггер-триггер или триггер), специфичные к гену Hif2 α (также называемый EPAS или HIF2 α), которые способны селективно и эффективно снижать экспрессию Hif2 α . Каждый РНКи-триггер содержит по меньшей мере смысловую цепь и антисмысловую цепь. Смысловая цепь и антисмысловая цепь могут являться частично, по существу или полностью комплементарными друг другу. Длина каждой смысловой и антисмысловой цепей РНКи-триггера, описанного в настоящей заявке, может составлять от 16 до 30 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смысловая и антисмысловая цепи независимо составляют от 17 до 26 нуклеотидов в длину. Смысловая и антисмысловая цепи могут иметь одинаковую длину или разную длину. РНКи-триггеры, описанные в настоящей заявке, после доставки в клетку, экспрессирующую ген Hif2 α , ингибируют экспрессию гена Hif2 α *in vitro* или *in vivo*. Примеры смысловых цепей и антисмысловых цепей РНКи-триггера Hif2 α , которые можно использовать в РНКи-триггере Hif2 α , представлены в табл. 1, 2 и 5.

Смысловая цепь РНКи-триггера Hif2 α содержит последовательность нуклеотидов, которая по меньшей мере на 90% идентична в пределах корового фрагмента, состоящего из по меньшей мере 16 последовательных нуклеотидов, последовательности мРНК Hif2 α . Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность нуклеотидов, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности мРНК Hif2 α , составляет 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида в длину. Антисмысловая цепь РНКи-триггера Hif2 α содержит последовательность нуклеотидов, которая по меньшей мере на 90% комплементарна в пределах корового фрагмента, состоящего из по меньшей мере 16 последовательных нуклеотидов, последовательности мРНК Hif2 α и соответствующей смысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения длина последовательности нуклеотидов, которая по меньшей мере на 90% комплементарна последовательности мРНК Hif2 α или соответствующей смысловой цепи, составляет 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один или более РНК-триггеров Hif2 α доставляют в клетки- или ткани-мишени с применением любой технологии доставки олигонуклеотидов, известной в данной области техники. Способы доставки нуклеиновой кислоты включают, но не ограничены указанными, доставку посредством инкапсуляции в липосомы, посредством ионтофореза или посредством встраивания в другие носители, такие как гидрогели, циклодекстрины, разлагаемые биологическим способом нанокapsулы и биоадгезивные микросферы, белковоподобные векторы или динамические поликонъюгаты (Dynamic PolyconjugatesTM, DPC). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α конъюгирован с нацеливающей группой, такой как интегринсвязывающее соединение. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α конъюгирован с полимером или носителем для доставки. Полимер для доставки может представлять собой обратимо модифицированный мембраноактивный полиамин. Полимер для доставки также может представлять собой нацеленный на интегрин обратимо модифицированный мембраноактивный полиамин.

Нацеленный на интегрин обратимо модифицированный мембраноактивный полиамин содержит мембраноактивный полиамин, конъюгированный с одним или более интегринсвязывающими соединениями обратимыми физиологически лабильными ковалентными связями. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеленный на интегрин обратимо модифицированный мембраноактивный полиамин дополнительно содержит мембраноактивный полиамин, конъюгированный с одним или более стерическими стабилизаторами обратимыми физиологически лабильными ковалентными связями. Интегринсвязывающие соединения могут представлять собой, но не ограничены указанными, пептиды RGD и миметики RGD. Обратимые физиологически лабильные ковалентные связи включают, но не ограничены указанными, дипептид-амидобензил-карбаматные связи, тетрапептидные связи и двузамещенные малеаматные связи.

РНК-триггеры Hif2 α необязательно объединены с одним или более дополнительными (т.е. вторым, третьим и т.д.) терапевтическими средствами. Второе терапевтическое средство может представлять собой другой РНК-триггер Hif2 α (например, РНК-триггер Hif2 α , который нацелен на другую последовательность в пределах мишени Hif2 α). Дополнительное терапевтическое средство может также представлять собой низкомолекулярный лекарственный препарат, антитело, фрагмент антитела и/или вакцину. РНК-триггеры Hif2 α с одним или более дополнительными терапевтическими средствами или без таковых могут быть объединены с одним или более вспомогательными веществами для получения фармацевтических композиций.

В настоящее изобретение также включены способы лечения субъекта-человека, страдающего от патологического состояния, по меньшей мере частично опосредованного экспрессией Hif2 α , причем указанные способы включают этап(ы) введения субъекту терапевтически эффективного количества РНК-триггера Hif2 α или композиции, содержащей РНК-триггер Hif2 α . Способ лечения субъекта РНК-триггером Hif2 α или композицией, содержащей РНК-триггер Hif2 α , можно необязательно объединить с одним или более этапами введения одного или более дополнительных (т.е. вторых) терапевтических средств или средств лечения. РНК-триггер Hif2 α и дополнительные терапевтические средства можно вводить в одной композиции или можно вводить по отдельности. Неограничивающие примеры дополнительных терапевтических средств включают, но не ограничены указанными, ингибиторы VEGFR (такие как Сутент®, Нексавар®, Вотриент®, Авастин®, Инлита®, Кабозантиниб®), цитокины (такие как ИЛ-2, ИФН- α), ингибиторы mTog (такие как Эверолимус®, Темсиролимус®), лекарственные препараты против PD1 (такие как Опдиво® и Кейтруда®), антитела против CTLA4 (такие как Ервой®), лекарственные препараты, нацеленные на компоненты пути передачи сигналов в раковых клетках (такие как VEGF, PI-3-киназа, MEK, JAK, Akt, MYC, Met, киназы семейства Src, Abl, Axl, Mer), антитела против PD-L1, против PD-L2, против TIM3, против LAG3, против CD28, против OX40, против OX-40L, против CD39, против CD40, против CD80, против CD86, против CD137, против 41BBL, против TIGIT, против GITR, против GIRTL, против CD155, против Fas, против FasL, против TRAIL/TRAIL-L, ингибитор IDO-1 и ингибитор TDO-2.

Фармацевтические композиции можно вводить множеством способов в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение, и в зависимости от области, лечение которой проводят. Введение может являться местным (например, посредством трансдермального пластыря), легочным (например, посредством ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, включая введение посредством небулайзера, внутритрахеальное, интраназальное введение), эпидермальным, трансдермальным, пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает, но не ограничено указанными, внутривенную, внутриартериальную, подкожную, интраперитонеальную или внутримышечную инъекцию или инфузию; субдермальное (например, посредством имплантируемого устройства), внутричерепное, интрапаренхимальное, интратекальное и внутривентрикулярное введение.

Описанные РНК-триггеры и/или содержащие их композиции Hif2 α можно использовать в способах терапевтического лечения заболеваний, включая, но не ограничиваясь указанными, рак, рак почки, светлоклеточную почечно-клеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, астроцитому (рак го-

ловного мозга), рак мочевого пузыря, рак молочной железы, хондросаркому, колоректальную карциному, карциному желудка, глиобластома, плоскоклеточную карциному головы и шеи, гепатоклеточную карциному, аденокарциному легкого, нейробластома, меланому, множественную миелому, рак яичников, рак прямой кишки, метастазы, гингивит, псориаз, герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши, презклампию, воспаление, хроническое воспаление, неоваскулярные заболевания и ревматоидный артрит. Такие способы включают введение РНК-триггера Hif2 α , описанного в настоящей заявке, субъекту, например субъекту-человеку или субъекту-животному.

Если не указано обратное, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют те значения, которые общепринято понимаются специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Несмотря на то что при реализации на практике или исследовании настоящего изобретения можно использовать способы и материалы, аналогичные или эквивалентные такому, описанным в настоящей заявке, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патент, патенты и другие источники, упомянутые в настоящей заявке, полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. В случае противоречия настоящая заявка, включая определения, будет определяющей. Кроме того, материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Другие свойства и преимущества настоящего изобретения будут очевидны на основании следующего подробного описания и формулы изобретения.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Химические структуры, представляющие модифицирующие агенты PEG_n-FCitFP-TFP.

Фиг. 2. Химические структуры, представляющие модифицирующие агенты RGD-PEG_n-FCitFP-TFP.

Фиг. 3. Химические структуры, представляющие модифицирующие агенты RGD-PEG_n-ACit-PABC-PNP.

Фиг. 4. Химические структуры, представляющие модифицирующие агенты альдегид-PEG_n-FCit-PABC-PNP.

Фиг. 5. Химические структуры, представляющие модифицирующие агенты альдегид-PEG_n-ACit-PABC-PNP.

Фиг. 6. Химические структуры, представляющие модифицирующие агенты SPDP-PEG_n-FCit-PABC-PNP.

Фиг. 7. Химические структуры, представляющие модифицирующие агенты PEG_n-ACit-PABC-PNP и PEG_n-FCit-PABC-PNP.

Фиг. 8. График, иллюстрирующий уровни SEAP (secreted alkaline phosphatase, секретируемой щелочной фосфатазы) в сыворотке в течение лечения у мышей. Кратность изменения уровней SEAP в сыворотке относительно уровней дня (-1) до введения. Для групп Г1 и Г2 n=4. Для Г3 n=3.

Фиг. 9. Макроскопическая морфология опухоли после 3-разового еженедельного лечения у мышей. Г1: наполнитель; Г2: 400 мкг Hif2 α -ITG-DPC; Г3: 280 мкг Hif2 α -ITG-DPC. Показаны обе почки от каждого животного. Опухоли имплантировали в почку, показанную справа. Все опухоли групп лечения являлись значительно меньшими, и в данных опухолях наблюдалось некоторое обесцвечивание по сравнению с контролями.

Фиг. 10. Окрашивание ГиЭ (гематоксилином и эозином) зафиксированных в формалине и залитых парафином срезов опухоли. Тонкими стрелками отмечены апоптотические клетки. Толстыми стрелками отмечена инфильтрация макрофагов. Чертеж А, Г1: группа, получавшая наполнитель. Типичная морфология RCC (renal cell carcinoma, почечно-клеточной карциномы) трубчатого типа с редкими апоптотическими клетками (тонкие стрелки). Чертеж В, Г2: группа, получавшая 400 мкг Hif2 α -ITG-DPC. Крупный некротический центр с множеством апоптотических клеток в окружающих областях и общей утратой структуры опухоли. Чертеж С, Г3: группа, получавшая 280 мкг Hif2 α -ITG-DPC. Разрушение типичных трубчатых структур опухоли с инфильтрацией макрофагов и множеством апоптотических клеток.

Подробное описание изобретения

В настоящей заявке описаны РНК-триггеры для ингибирования экспрессии гена Hif2 α (в настоящей заявке обозначены как РНК-триггеры Hif2 α). Каждый РНК-триггер Hif2 α содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь. Смысловая цепь и антисмысловая цепь являются частично, по существу или полностью комплементарными друг другу. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения длина смысловой и антисмысловой цепи описанного в настоящей заявке РНК-триггера независимо составляет от 16 до 30 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения длина смысловой и антисмысловой цепи описанного в настоящей заявке РНК-триггера независимо составляет от 17 до 26 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смысловая и антисмысловая цепи описанного в настоящей заявке РНК-триггера независимо составляют 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов в длину. Смысловая и антисмысловая цепи могут характеризоваться одинаковой длиной или разной длиной. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смысловая цепь составляет приблизительно 19 нуклеотидов в длину, тогда как антисмысловая цепь составляет приблизительно 21 нуклеотид в длину. Согласно некото-

рым вариантам реализации настоящего изобретения смысловая цепь составляет приблизительно 21 нуклеотид в длину, тогда как антисмысловая цепь составляет приблизительно 23 нуклеотида в длину. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения смысловая и антисмысловая цепи независимо составляют 17-21 нуклеотид в длину. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения каждая из смысловой и антисмысловой цепей составляет 21-26 нуклеотидов в длину. Примеры последовательностей нуклеотидов, использованных при получении молекул РНКи-триггера Hif2 α , представлены в табл. 1, 2 и 5.

РНКи-триггеры включают, но не ограничены указанными, малую интерферирующую РНК (миРНК), двухцепочечную РНК (дцРНК), микроРНК, малую шпилечную РНК (мшРНК) и дайсер-субстраты (патенты США № 8084599, 8349809 и 8513207). РНКи-триггеры, описанные в настоящей заявке, после доставки в клетку, экспрессирующую ген Hif2 α , ингибируют или вызывают нокдаун экспрессии гена Hif2 α *in vitro* или *in vivo* за счет биологического процесса РНК-интерференции (РНКи).

РНКи-триггер Hif2 α содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, каждая из которых содержит коровую последовательность, состоящую из 16-23 нуклеотидных оснований в длину. Коровая последовательность антисмысловой цепи является на 100% (совершенно) комплементарной или по меньшей мере на 90% (по существу) комплементарной последовательности нуклеотидов (иногда называемой, например, целевой последовательностью), присутствующей в мРНК Hif2 α . Коровая последовательность смысловой цепи является на 100% (совершенно) комплементарной или по меньшей мере на 90% (по существу) комплементарной последовательности в антисмысловой цепи, и, таким образом, коровая последовательность смысловой цепи является совершенно идентичной или по меньшей мере на 90% идентичной последовательности нуклеотидов (целевой последовательности), присутствующей в мРНК Hif2 α . Коровая последовательность смысловой цепи может характеризоваться такой же длиной, что и соответствующая коровая последовательность антисмысловой цепи, или может характеризоваться отличной длиной. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения коровая последовательность антисмысловой цепи составляет 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида в длину. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения коровая последовательность смысловой цепи составляет 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида в длину.

Смысловую и антисмысловую цепи РНКи-триггера Hif2 α , как правило, отжигают для получения дуплекса. В пределах комплементарной области дуплекса коровая последовательность смысловой цепи является по меньшей мере на 90% комплементарной или на 100% комплементарной коровой последовательности антисмысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения коровая последовательность смысловой цепи содержит последовательность, содержащую по меньшей мере 16%, по меньшей мере 17%, по меньшей мере 18%, по меньшей мере 19%, по меньшей мере 20% или по меньшей мере 21% нуклеотид, которая является по меньшей мере на 90% или на 100% комплементарной соответствующей коровой последовательности антисмысловой цепи, содержащей 16, 17, 18, 19, 20 или 21 нуклеотид (т.е. коровые последовательности смысловой цепи и антисмысловой цепи РНКи-триггера Hif2 α содержат область, содержащую по меньшей мере 16%, по меньшей мере 17%, по меньшей мере 18%, по меньшей мере 19%, по меньшей мере 20% или по меньшей мере 21% нуклеотид, по меньшей мере 90% оснований которой являются спаренными или 100% оснований которой являются спаренными).

В настоящей заявке термин "последовательность" или "последовательность нуклеотидов" относится к последовательности или порядку нуклеотидных оснований, нуклеотидов и/или нуклеозидов, описанных с помощью последовательности букв с применением стандартной номенклатуры нуклеотидов и символов модифицированных нуклеотидов, описанных в настоящей заявке.

В настоящей заявке, если не указано обратное, термин "комплементарный" при использовании для описания первой последовательности нуклеотидов (например, смысловой цепи РНКи-триггера или мРНК Hif2 α) относительно второй последовательности нуклеотидов (например, антисмысловой цепи РНКи-триггера) относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую последовательность нуклеотидов, гибридизоваться (образовывать водородные связи между парами оснований) и образовывать дуплекс или двойную спиральную структуру при определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую последовательность нуклеотидов. Комплементарные последовательности включают уотсон-криковские пары оснований или пары оснований, отличные от уотсон-криковских, и включают природные или модифицированные нуклеотиды или миметики нуклеотидов при условии, что выполнены вышеуказанные требования в отношении способности нуклеотидов к гибридизации. "Совершенно комплементарный" или "полностью комплементарный" означает, что все (100%) из оснований в непрерывной последовательности первого полинуклеотида будут гибридизоваться с таким же количеством оснований в непрерывной последовательности второго полинуклеотида. Непрерывная последовательность может содержать всю или часть первой или второй последовательности нуклеотидов. В настоящей заявке "частично комплементарный" означает, что в гибридизованной паре последовательностей нуклеиновых оснований по меньшей мере 70% оснований в непрерывной последовательности первого полинуклеотида будут гибридизоваться с таким же количеством осно-

ваний в непрерывной последовательности второго полинуклеотида. В настоящей заявке "по существу комплементарный" означает, что в гибридизованной паре последовательностей нуклеиновых оснований по меньшей мере 85% оснований в непрерывной последовательности первого полинуклеотида будут гибридизоваться с таким же количеством оснований в непрерывной последовательности второго полинуклеотида. Термины "комплементарный", "полностью комплементарный" и "по существу комплементарный" в настоящей заявке могут использоваться в отношении совпадения оснований между смысловой цепью и антисмысловой цепью РНК-триггера или между антисмысловой цепью РНК-триггера и последовательностью мРНК Hif2 α . Идентичность или комплементарность последовательности не зависит от модификации. С целью определения идентичности или комплементарности, например, а и Af являются комплементарными U (или T) и идентичными A.

Смысловая цепь и/или антисмысловая цепь могут необязательно и независимо содержать дополнительные 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов (удлинение) на 3'-конце, 5'-конце или и 3'- и 5'-конце коровых последовательностей. Дополнительные нуклеотиды антисмысловой цепи в случае наличия могут являться комплементарными соответствующей последовательности мРНК Hif2 α или могут не являться комплементарными указанной последовательности. Дополнительные нуклеотиды смысловой цепи в случае наличия могут являться идентичными соответствующей последовательности мРНК Hif2 α или могут не являться идентичными указанной последовательности. Дополнительные нуклеотиды антисмысловой цепи в случае наличия могут являться комплементарными дополнительным нуклеотидам соответствующей смысловой цепи в случае наличия или могут не являться комплементарными указанной последовательности.

В настоящей заявке удлинение содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов на 5'- и/или 3'-конце коровой последовательности смысловой цепи и/или коровой последовательности антисмысловой цепи. Нуклеотиды удлинения смысловой цепи могут являться комплементарными нуклеотидам - нуклеотидам коровой последовательности или нуклеотидам удлинения - в соответствующей антисмысловой цепи или могут не являться комплементарными указанным нуклеотидам. И наоборот, нуклеотиды удлинения антисмысловой цепи могут являться комплементарными нуклеотидам - нуклеотидам коровой последовательности или нуклеотидам удлинения - в соответствующей смысловой цепи или могут не являться комплементарными указанным нуклеотидам. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь РНК-триггера содержит 3'- и 5'- удлинения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один или более нуклеотидов 3'-удлинения одной цепи образуют пару оснований с одним или более нуклеотидами 5'-удлинения другой цепи. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения один или более нуклеотидов 3'-удлинения одной цепи не образуют пару оснований с одним или более нуклеотидами 5'-удлинения другой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α содержит антисмысловую цепь, содержащую 3'-удлинение, и смысловую цепь, содержащую 5'-удлинение.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекула РНК-триггера Hif2 α содержит антисмысловую цепь, содержащую 3'-удлинение, составляющее 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов в длину. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения молекула РНК-триггера Hif2 α содержит антисмысловую цепь, содержащую 3'-удлинение, составляющее 1, 2 или 3 нуклеотида в длину. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один или более нуклеотидов удлинения антисмысловой цепи содержат нуклеотиды урацил или тимидин или нуклеотиды, которые являются комплементарными соответствующей последовательности мРНК Hif2 α . Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения удлинение антисмысловой цепи может представлять собой, но не ограничено указанными, uAu, uGu, udTsdT, usdTsdT, UfAu, Aua, Afsusa, UAU, uAfu, uau, udAu, uscu, usgu, uscsu, cAu, aUa, aua, u(invda)u, cag, agu, gcg, caa, usasu, uAMTM, или usTMsAM (каждые приведены в направлении от 5' к 3'; обозначения те же, что и для табл. 2).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекула РНК-триггера Hif2 α содержит антисмысловую цепь, содержащую 5'-удлинение, составляющее 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов в длину. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения молекула РНК-триггера Hif2 α содержит антисмысловую цепь, содержащую 5'-удлинение, составляющее 1 или 2 нуклеотида в длину. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один или более нуклеотидов удлинения антисмысловой цепи содержат нуклеотиды урацил или тимидин или нуклеотиды, которые являются комплементарными соответствующей последовательности мРНК Hif2 α . Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения удлинение антисмысловой цепи содержит dA, dT, pdT, vpdT или u или состоит из указанных нуклеотидов, где dA и dT представляют собой нуклеотиды дезоксиаденозин и дезокситимидин соответственно, pdT представляет собой нуклеотид дезокситимидин, содержащий 5'-фосфат, vpdT представляет собой нуклеотид винилфосфонат-дезокситимидин, и u представляет собой 2'-ОМе-модифицированный нуклеотид урацил. Антисмысловая цепь может содержать любое из 3'-удлинений, описанных выше, в сочетании с любым из описанных 5'-удлинений антисмысловой цепи в случае наличия.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекула РНК-триггера

Hif2 α содержит смысловую цепь, содержащую 3'-удлинение, составляющее 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов в длину. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один или более нуклеотидов удлинения смысловой цепи содержат нуклеотиды аденозин, урацил или тимидин, динуклеотид АТ или нуклеотиды, которые соответствуют нуклеотидам в последовательности мРНК Hif2 α . Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 3'-удлинение смысловой цепи содержит Af, invdA, invdT, A(invdT), Af(invdT), U(invdT), Uf(invdT), AfAbuAu, dTdT или dTsdT или состоит из указанных нуклеотидов, где Af и Uf представляют собой нуклеотиды 2'-фтораденозин и урацил соответственно, invdA и invdT представляют собой 3' - 3'-связанные (инвертированные) нуклеотиды дезоксиаденозин и дезокситимидин соответственно, Ab представляет собой рибозу с удаленным азотистым основанием и представляет собой 2'-ОМе - модифицированный нуклеотид урацил, dT представляет собой нуклеотид дезокситимидин, sdT представляет собой нуклеотид дезокситимидин, содержащий 5'-фосфотиоат и U и A представляют собой рибонуклеотиды урацил и аденозин.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекула РНК-триггера Hif2 α содержит смысловую цепь, содержащую 5'-удлинение, составляющее 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов в длину. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один или более нуклеотидов удлинения смысловой цепи содержат нуклеотиды урацил или аденозин или нуклеотиды, которые соответствуют нуклеотидам в последовательности мРНК Hif2 α . Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 5'-удлинение смысловой цепи может представлять собой, но не ограничено указанными, uAuAus, uAuAu, UAUUAGfs, UfaUfaA, uauaA, AUAUU, AfuAfuU, auauU, uaUfau, UAU(UUNA), uauau, udAudAu, uuAga, uuAuu, uuGAu, uuaa, uAua, uAuaGas, uAuaas, udAuau, adTaga, auaga, u(invda)uau, gacau, ugaau, gcgau, uauga, uugga или auaga (каждые приведены в направлении от 5' к 3'; обозначения те же, что и для табл. 2). Смысловая цепь может содержать 3'-удлинение и/или 5'-удлинение.

Последовательности смысловой цепи и антисмысловой цепи немодифицированного РНК-триггера Hif2 α представлены в табл. 1 и 5. При образовании РНК-триггеров Hif2 α каждый из нуклеотидов в каждой из последовательностей, перечисленных в табл. 1 и 5, может представлять собой модифицированный нуклеотид.

Таблица 1

Последовательности антисмысловой цепи и смысловой цепи немодифицированного РНК-триггера Hif2 α

SEQ ID NO.	Последовательность антисмысловой цепи, 5' → 3'	SEQ ID NO.	Последовательность смысловой цепи, 5' → 3'
1	AGUAAAACAAUUGUGUACUUU	57	AGUACACAAUUGUUUACUT
2	AGUAAAACAAUUGUGUACUUAA	44	AAAGUACACAAUUGUUUACT
3	AUUC AUGAAAUCGUUACGUTG	52	ACGUAACGAUUUCAUGAATT
4	AUUC AUGAAAUCGUUACGUUG	52	ACGUAACGAUUUCAUGAATT
4	AUUC AUGAAAUCGUUACGUUG	53	ACGUAACGAUUUCAUGAAU
4	AUUC AUGAAAUCGUUACGUUG	54	ACGUAACGAUUUCAUGAAT
4	AUUC AUGAAAUCGUUACGUUG	73	UAUACGUAACGAUUUCAUGAAT
4	AUUC AUGAAAUCGUUACGUUG	74	UAUACGUAACGAUUUCAUGAATT
5	AUUC AUGAAAUCGUUACGUUGAT	47	AACGUAACGAUUUCAUGAAT
6	AUUC AUGAAAUCGUUACGUUGC	77	UAUCAACGUAACGAUUUCAUGAATT
7	TAAAU CGUUCGUUACGAGTT	67	CUGUCAACGUAACGAUUUAT
8	TAACCAUACGUUACGAGUTT	55	ACUCCAACGUAUGUGGUUAT
9	TAAGUUAAGCUCCAUACATT	81	UGUAUGGGAGCUUAACUUAT
10	TAAUCGUUACGUUACGAGTT	63	CCUGUCAACGUAACGAUUAT
11	TACGUUACGAGGUAGGUUTT	45	AACCCUACCGUCAACGUAT
12	TAGAGGAGCUUGUGUUCTT	68	GAACACACAAGCUCCUCUAT
13	TAGCUUGUGUUCGACAGTT	62	CCUGCGAACACACAAGCUAT
14	TAGGAGCUUGUGUUCGCTT	69	GCGAACACACAAGCUCCUAT
15	TAUCGUUACGUUACGAGUTT	49	ACCUGUCAACGUAACGUAAT
15	TAUCGUUACGUUACGAGUTT	71	UAUACCGUCAACGUAACGUAAT
16	TCAUGAAAUCGUUACGUUGTT	60	CAACGUAACGAUUUCAUGAT
17	TCGUUACGUUACGAGGUAGTT	65	CUACCGUCAACGUAACGAT
18	TCUAGCAACAAAACCUAATT	82	UUAAGGUUUUGUUGCUAGAT
19	TGAGCUUGUGUUCGACAGTT	66	CUGCGAACACACAAGCUCAT
19	TGAGCUUGUGUUCGACAGTT	68	GAACACACAAGCUCCUCUAT
20	TGAGGAGCUUGUGUUCGTT	64	CGAACACACAAGCUCCUCAT

21	TGGAGCUUGUGUGUUCGCATT	79	UGCGAACACACAAGCUCCAT
22	TGGUACUGGGUGGCGUAGCTT	70	GCUACGCCACCCAGUACCAT
23	TGUA AAAACAAUUGUGUACUTT	56	AGUACACAAUUGUUUUACAT
24	TUACGUUGACAGGUAGGGUTT	48	ACCCUACCUGUCAAGGUAAT
25	TUCGUUACGUUGACAGGUATT	78	UCACUGUCAACGUAACGAAT
26	TUGAUAAAACACUUAACCCATT	80	UGGGUUAAGUGUUUAUCAAT
27	TUGUCACGAUGCGGUGGUUTT	61	CAGUGCAACGCCACCCAGAT
28	TUUCAUGAAAUCGUUACGUCGGCUAU	76	UAUAUCGACGUAACGAUUUCAUGAA A
29	TUUCAUGAAAUCGUUACGUCGGCUGU	76	UAUAUCGACGUAACGAUUUCAUGAA A
30	TUUCAUGAAAUCGUUACGUTT	50	ACGUAACGAUUUCAUGAAA
30	TUUCAUGAAAUCGUUACGUTT	51	ACGUAACGAUUUCAUGAAAT
30	TUUCAUGAAAUCGUUACGUTT	72	UAUACGUAACGAUUUCAUGAAAT
31	TUUCAUGAAAUCGUUACGUUGGC	59	CAACGUAACGAUUUCAUGAAA
32	TUUCAUGAAAUCGUUACGUUGGCUA U	75	UAUAUCAACGUAACGAUUUCAUGAA A
33	TUUCAUGAAAUCGUUACGUUGGCUG U	75	UAUAUCAACGUAACGAUUUCAUGAA A
34	TUUCAUGAAAUCGUUACGUUGGCUTT	75	UAUAUCAACGUAACGAUUUCAUGAA A
35	UCAUGAAAUCGUUACGUUGTT	58	CAACGUAACGAUUUCAUGA
35	UCAUGAAAUCGUUACGUUGTT	58	CAACGUAACGAUUUCAUGA
36	UCUAGCAACAAAACCUAATT	82	UUAAGGUUUUGUUGCUAGAT
37	UGUAAAACAAUUGUGUACUTT	56	AGUACACAAUUGUUUUACAT
38	UGUAAAACAAUUGUGUACUUU	56	AGUACACAAUUGUUUUACAT
39	UGUAAAACAAUUGUGUACUUUAA	43	AAAGUACACAAUUGUUUUACA
40	UUUCAUGAAAUCGUUACGUTT	51	ACGUAACGAUUUCAUGAAAT
40	UUUCAUGAAAUCGUUACGUTT	72	UAUACGUAACGAUUUCAUGAAAT
41	UUUCAUGAAAUCGUUACGUUG	50	ACGUAACGAUUUCAUGAAA
41	UUUCAUGAAAUCGUUACGUUG	51	ACGUAACGAUUUCAUGAAAT
41	UUUCAUGAAAUCGUUACGUUG	72	UAUACGUAACGAUUUCAUGAAAT
42	UUUCAUGAAAUCGUUACGUUGAT	46	AACGUAACGAUUUCAUGAAAT

РНКи-триггеры Hif2 α , описанные в настоящей заявке, получены в результате отжига антисмысловой цепи со смысловой цепью. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антисмысловая цепь РНКи-триггера Hif2 α содержит последовательность нуклеотидов любой из последовательностей, представленных в табл. 1 и 5. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антисмысловая цепь РНКи-триггера Hif2 α содержит последовательность нуклеотидов 1-17, 2-17, 1-18, 2-18, 1-19, 2-19, 1-20, 2-20, 1-21, 2-21, 1-22, 2-22, 1-23, 2-23, 1-24, 2-24, 1-25, 2-25, 1-26 или 2-26 любой из последовательностей, представленных в табл. 1 и 5. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смысловая цепь РНКи-триггера Hif2 α содержит последовательность нуклеотидов любой из последовательностей, представленных в табл. 1 и 5. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смысловая цепь РНКи-триггера Hif2 α содержит последовательность нуклеотидов 1-17, 2-17, 1-18, 2-18, 1-19, 2-19, 1-20, 2-20, 1-21, 2-21, 1-22, 2-22, 1-23, 2-23, 1-24, 2-24, 1-25, 2-25, 1-26 или 2-26 любой из последовательностей, представленных в табл. 1 и 5.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смысловая и антисмысловая цепи РНКи-триггеров, описанных в настоящей заявке, содержат одинаковое количество нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смысловая и антисмысловая цепи РНКи-триггеров, описанных в настоящей заявке, содержат различные количества нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 5'-конец смысловой цепи и 3'-конец антисмысловой цепи РНКи-триггера образуют тупой конец. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 3'-конец смысловой цепи и 5'-конец антисмысловой цепи РНКи-триггера образуют тупой конец. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения оба конца РНКи-триггера образуют тупой конец. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ни один из концов РНКи-триггера не является тупым. В настоящей заявке тупой конец относится к концу двухцепочечной молекулы триггера, в котором концевые нуклеотиды двух отоженных цепей являются комплементарными (образуют комплементарные пары оснований). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 5'-конец смысловой цепи и 3'-конец антисмысловой цепи РНКи-триггера образуют неспаренный конец. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 3'-конец смысловой цепи и 5'-конец антисмысловой цепи РНКи-триггера образуют раздвоенный конец. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения оба конца РНКи-триггера образуют раздвоенный конец. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ни один из концов РНКи-триггера не является раздвоенным. В настоящей заявке раздвоенный конец относится к концу двухцепочечной молекулы триггера, в котором концевые нуклеотиды двух отоженных цепей образуют пару (т.е. не образуют выступа), но не являются комплементарными (т.е. образуют некомплеметарную пару). В настоящей заявке выступ представляет собой фрагмент, состоящий из одного или более неспаренных нук-

леотидов на конце одной цепи двухцепочечной молекулы РНК-триггера. Неспаренные нуклеотиды могут находиться в смысловой цепи или антисмысловой цепи, образуя 3'- или 5'-выступы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекула РНК-триггера содержит тупой конец и раздвоенный конец, тупой конец и 5'-выступающий конец, тупой конец и 3'-выступающий конец, раздвоенный конец и 5'-выступающий конец, раздвоенный конец и 3'-выступающий конец, два 5'-выступающих конца, два 3'-выступающих конца, 5'-выступающий конец и 3'-выступающий конец, два раздвоенных конца или два тупых конца.

Нуклеотидное основание (или нуклеооснование) представляет собой гетероциклическое пиримидиновое или пуриновое соединение, которое является компонентом всех нуклеиновых кислот и включает аденин (A), гуанин (G), цитозин (C), тимин (T) и урацил (U). В настоящей заявке каждый "G", "g", "C", "c", "A", "a", "U", "u" и "T", как правило, означает нуклеооснование, нуклеозид, нуклеотид или миметик нуклеотида, который содержит в качестве основания гуанин, цитозин, аденин, урацил и тимидин. Также в настоящей заявке термин "нуклеотид" может включать модифицированный нуклеотид или миметик нуклеотида, участок с удаленным азотистым основанием или суррогатный замещающий фрагмент.

В настоящей заявке "модифицированный нуклеотид" представляет собой нуклеотид, отличный от рибонуклеотида (2'-гидроксинуклеотида). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α содержит один или более модифицированных нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% нуклеотидов являются модифицированными. Модифицированные нуклеотиды включают, но не ограничены указанными, дезоксинуклеотиды, миметики нуклеотидов, нуклеотиды с удаленным азотистым основанием (представленные в настоящей заявке как X или Ab), 2'-модифицированные нуклеотиды, нуклеотиды с 3' - 3'-связями (инвертированные) (представленные в настоящей заявке как invdN, invN, invn, invX), нуклеотиды, содержащие неприродное основание, мостиковые нуклеотиды, пептидные нуклеиновые кислоты, миметики 2',3'-секонуклеотидов (незапертые аналоги нуклеооснования, представленные в настоящей заявке как N_{UNA} или NUNA), запертые нуклеотиды (представленные в настоящей заявке как N_{LNA} или NLNA), 3'-O-метокси (связанные 2'-внутринуклеотидной связью) нуклеотиды (представленные в настоящей заявке как 3'-OMen), 2'-F-арабинонуклеотиды (представленные в настоящей заявке как NfANA или Nf_{ANA}), морфолино-нуклеотиды, винилфосфонат-деоксирибонуклеотиды (представленные в настоящей заявке как vpdN) и винилфосфонат-нуклеотиды. 2'-модифицированные нуклеотиды (т.е. нуклеотид с группой, отличной от гидроксильной группы, в положении 2' пятичленного кольца сахара) включают, но не ограничены указанными, 2'-O-метилнуклеотиды (представленные в настоящей заявке строчной буквой "n" в последовательности нуклеотидов), 2'-дезоксиде-2'-фторнуклеотиды (представленные в настоящей заявке как Nf, также представленные в настоящей заявке как 2'-фторнуклеотид), 2'-дезоксинуклеотиды (представленные в настоящей заявке как dN), 2'-метоксиэтил (2'-O-2-метоксиэтил) нуклеотиды (представленные в настоящей заявке как NM или 2'-MOE), 2'-аминонуклеотиды, 2'-алкилнуклеотиды. Необязательно, чтобы все положения в данном соединении являлись единообразно модифицированными. И наоборот, более чем одна модификация может быть введена в один РНК-триггер Hif2 α или даже в один нуклеотид указанного триггера. Смысловые цепи и антисмысловые цепи РНК-триггера Hif2 α могут быть синтезированы и/или модифицированы способами, известными в данной области техники. Модификация одного нуклеотида не зависит от модификации другого нуклеотида.

Модифицированные нуклеотиды также включают нуклеотиды, содержащие модифицированные нуклеотидные основания. Модифицированные нуклеотидные основания включают, но не ограничены указанными, синтетические и природные нуклеотидные основания, 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6-замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин, 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галоурацил и цитозин, 5-пропинилурацил и цитозин, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-гало, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-гало, в особенности, 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 и 3-деазагуанин и 3-деазааденин.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 20% или менее модифицированных нуклеотидов представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит 2'-F нуклеотид в положении 11 от 3'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит 2'-F нуклеотид в положении 12 от 3'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит 2'-F нуклеотид в положении 13 от 3'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит по меньшей мере два 2'-F нуклеотида в по-

ложениях 11, 12 и 13 от 3'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит 2'-F нуклеотиды в положениях 11 и 12, положениях 11 и 13 или положениях 12 и 13 от 3'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит 2'-F нуклеотиды в положениях 11, 12 и 13 от 3'-конца.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антисмысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит 2'-F нуклеотид в положении 2 от 5'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антисмысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит 2'-F нуклеотид в положении 14 от 5'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антисмысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит 2'-F нуклеотиды в положениях 2 и 14 от 5'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α содержит по меньшей мере два 2'-F нуклеотида в положениях 11, 12 и 13 от 3'-конца смысловой цепи и в положениях 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антисмысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит 2'-F нуклеотид в положении 4 от 5'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антисмысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит 2'-F нуклеотид в положении 6 от 5'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антисмысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит 2'-F нуклеотид в положении 8 от 5'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антисмысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит 2'-F нуклеотид в положении 10 от 5'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антисмысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит 2'-F нуклеотид в положении 12 от 5'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антисмысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит по меньшей мере два 2'-F нуклеотида в положениях 4, 6, 8, 10 и 12 от 5'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антисмысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит 2'-F нуклеотиды в положениях 4 и 6, положениях 4 и 8, положениях 4 и 10, положениях 4 и 12, положениях 6 и 8, положениях 6 и 10, положениях 6 и 12, положениях 8 и 10, положениях 8 и 12 или положениях 10 и 12 от 5'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антисмысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит три 2'-F нуклеотида в положениях 4, 6, 8, 10 и 12 от 5'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антисмысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит по меньшей мере четыре 2'-F нуклеотида в положениях 4, 6, 8, 10 и 12 от 5'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антисмысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит 2'-F нуклеотиды в положениях 4, 6, 8 и 10, положениях 4, 6, 8 и 12, положениях 4, 6, 10 и 12, положениях 4, 8, 10 и 12 или положениях 6, 8, 10 и 12 от 5'-конца.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антисмысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит 2'-F нуклеотид в положении 2 и/или положении 14 и один, два или три нуклеотида 2'-F в положениях 11, 12 и 13 от 5'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α содержит 2'-F нуклеотид в положении 2 и/или положении 14 и один, два или три 2'-F нуклеотида в положениях 11, 12 и 13 от 5'-конца антисмысловой цепи и по меньшей мере два 2'-F нуклеотида в положениях 11, 12 и 13 от 3'-конца смысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один или более нуклеотидов РНК-триггера Hif2 α связаны нестандартными связями или остовами (т.е. модифицированными межнуклеозидными связями или модифицированными остовами). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой ковалентную межнуклеозидную связь, не содержащую фосфат. Модифицированные межнуклеозидные связи или остовы включают, но не ограничены указанными, фосфотиоаты, 5'-фосфотиоатную группу (представленную в настоящей заявке как строчная буква "s" перед нуклеотидом, как в случае sN, sn, sNf или sdN), хиральные фосфотиоаты, тиофосфат, фосфодитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкил-фосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкил-фосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры, морфолино-связи и боранофосфаты, содержащие нормальные 3'-5'-связи, 2'-5'-связанные аналоги указанных соединений и соединения, которые характеризуются инвертированной полярностью, при которой прилежащие пары нуклеозидных единиц связаны 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения в модифицированной межнуклеозидной связи или остове отсутствует атом фосфора. Модифицированные межнуклеозидные связи, в которых отсутствует атом фосфора, включают, но не ограничены указанными, короткоцепочечные алкильные или циклоалкильные связи между сахарами, смешанные гетероатомные и алкильные или циклоалкильные связи между сахарами или одну или более короткоцепочечных гетероатомных или гетероциклических связей между сахарами. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения модифицированные внутринуклеозидные остовы включают, но не ограничены

указанными, силоксановые остовы, сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы, метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы, алкен-содержащие остовы, сульфаматные остовы, метилениминовые и метиленигидразиновые остовы, сульфонатные и сульфонамидные остовы, амидные остовы; и другие, содержащие смешанные компоненты N, O, S и CH₂.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α содержит один или более модифицированных нуклеотидов и одну или более модифицированных межнуклеозидных связей. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 2'-модифицированный нуклеотид объединен с модифицированной межнуклеозидной связью. Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смысловая цепь РНК-триггера Hif2 α может содержать 1, 2, 3, 4 фосфотиоатные связи, антисмысловая цепь РНК-триггера Hif2 α может содержать 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные связи или как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь независимо может содержать 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные связи.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения смысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит две фосфотиоатные межнуклеозидные связи. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения две фосфотиоатные межнуклеозидные связи находятся между нуклеотидами в положениях 1-3 от 3'-конца смысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения две фосфотиоатные межнуклеозидные связи находятся между нуклеотидами в положениях 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 4-5 или 6-8 от 5'-конца смысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антисмысловая цепь РНК-триггера Hif2 α содержит четыре фосфотиоатные межнуклеозидные связи. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения четыре фосфотиоатные межнуклеозидные связи находятся между нуклеотидами в положениях 1-3 от 5'-конца смысловой цепи и между нуклеотидами в положениях 19-21, 20-22, 21-23, 22-24, 23-25 или 24-26 от 5'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α содержит две фосфотиоатные межнуклеозидные связи в смысловой цепи и четыре фосфотиоатные межнуклеозидные связи в антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α получен или предложен в виде соли, смешанной соли или свободной кислоты.

Примеры антисмысловых цепей, содержащих модифицированные нуклеотиды, представлены в табл. 2А и 5В. Примеры смысловых цепей, содержащих модифицированные нуклеотиды, представлены в табл. 2В и 5В. В табл. 2А, 2В и 5В для обозначения модифицированных нуклеотидов использованы следующие сокращения.

N	= 2'-ОН (немодифицированный) рибонуклеотид (прописная буква без указания f или d)
n	= 2'-ОМе-модифицированный нуклеотид
Nf	= 2'-фтор-модифицированный нуклеотид
dN	= 2'-дезоксинуклеотиды
N _{UNA}	= миметики 2',3'-секонуклеотидов (незакрытые аналоги нуклеоснований)
NM	= 2'-метоксиэтилнуклеотид
(invdN)	= инвертированный дезоксирибонуклеотид (3' – 3'-связанный нуклеотид)
(invAb)	= инвертированный нуклеотид с удаленным основанием
s	= фосфотиоат-связанный нуклеотид
p	= фосфат
vpdN	= винилфосфонат-дезоксирибонуклеотид

Таблица 2А

Антисмысловые цепи РНК-триггера Hif2 α , содержащие
модифицированные нуклеотиды

Идентиф. номер антисмыслов ой цепи	Последовательность антисмысловой цепи (5' → 3')	SEQ ID NO.	SEQ ID NO. немодифициров анной последовательн ости
AM00159-AS	dTGfgAfgCfuUfgUfgUfgUfuCfcCfadTsdT	112	21
AM00160-AS	dTGfgUfaCfuGfgGfuGfgCfgUfaGfcdTsdT	113	22
AM00161-AS	dTCfgUfuAfcGfuUfgAfcAfgGfuAfgdTsdT	106	17
AM00162-AS	dTAfgCfuUfgUfgUfgUfuCfcCfaGfgdTsdT	103	13
AM00163-AS	dTGfaGfcUfuGfuGfuGfuUfcGfcAfgdTsdT	110	19
AM00164-AS	dTAfgGfaGfcUfuGfuGfuGfuUfcGfcdTsdT	104	14
AM00165-AS	dTGfaGfgAfgCfuUfgUfgUfgUfuCfgdTsdT	111	20
AM00166-AS	dTAfgAfgGfaGfcUfuGfuGfuGfuUfcdTsdT	102	12
AM00167-AS	dTUfgUfcAfcGfaUfgCfcGfuGfgUfudTsdT	137	27
AM00168-AS	dTAfcGfuUfgAfcAfgGfuAfgGfgUfudTsdT	101	11
AM00169-AS	dTUfaCfgUfuGfaCfaGfgUfaGfgGfudTsdT	135	24
AM00170-AS	dTUfcGfuUfaCfgUfuGfaCfaGfgUfadTsdT	136	25
AM00171-AS	dTAfuCfgUfuAfcGfuUfgAfcAfgGfudTsdT	105	15
AM00172-AS	dTAfaUfcGfuUfaCfgUfuGfaCfaGfgdTsdT	100	10
AM01770-AS	dTGfuAfaAfaCfaAfuUfgUfgUfaCfudTsdT	114	23
AM01772-AS	dTGfuAfaAUNAaCfaAfuUfgUfgUfaCfudTsdT	116	23
AM01773-AS	dTGfuAfaAfaUNACfaAfuUfgUfgUfaCfudTsdT	115	23
AM01775-AS	dTCfuAfgCfaAfcAfaAfaCfcUfuAfadTsdT	107	18
AM01777-AS	dTCfuAfgCUNAaAfcAfaAfaCfcUfuAfadTsdT	109	18
AM01778-AS	dTCfuAfgCfaUNAaAfcAfaAfaCfcUfuAfadTsdT	108	18
AM01780-AS	dTAfaAfuCfgUfuAfcGfuUfgAfcAfgdTsdT	94	7
AM01782-AS	dTAfaAfuCUNAgUfuAfcGfuUfgAfcAfgdTsdT	96	7
AM01783-AS	dTAfaAfuCfGUNAUfuAfcGfuUfgAfcAfgdTsdT	95	7
AM01784-AS	dTUfuCfaUfgAfaAfuCfuUfuAfcGfudTsdT	138	30
AM01786-AS	dTUfuCfaUUNAgAfaAfuCfuUfuAfcGfudTsdT	145	30
AM01787-AS	dTUfuCfaUfGUNAAfaAfuCfuUfuAfcGfudTsdT	144	30
AM01789-AS	dTAfaGfuUfaAfgCfuCfcCfaUfaCfadTsdT	97	9
AM01791-AS	dTAfaGfuUUNAaAfgCfuCfcCfaUfaCfadTsdT	99	9
AM01792-AS	dTAfaGfuUfaUNAaAfgCfuCfcCfaUfaCfadTsdT	98	9
AM02090-AS	dTUfuCfaUfgAUNAaAfuCfuUfuAfcGfudTsdT	143	30

AM02091-AS	dTUfuCfaUfgAfaUNAafuCfgUfuAfcGfudTsdT	142	30
AM02092-AS	dTUfuCfaUfgAfaAfuCfgUfUUNAafcGfudTsdT	139	30
AM02133-AS	dTUfuCfaUfgAfaAfuCgUfuAfcGfudTsdT	141	30
AM02140-AS	dTsUfsuCfaUfgAfaAfuCgUfuAfcGfuUfgsgsc	128	31
AM02145-AS	dTsUfsuCfaUfgAfaAfuCgUfuAfcGfuUfggscsuGu	127	33
AM02146-AS	dTsUfsuCfaUfgAfaAfuCgUfuAfcGfuCfsgscsuGu	123	29
AM02147-AS	dTsUfsuCfaUfgAfaAfuCgUfuAfcGfuUfggscsuAu	126	32
AM02150-AS	dTsUfsuCfaUfgAfaAfuCgUfuAfcGfuUfggscsdTsdT	125	34
AM02327-AS	pdTUfuCfaUfgAfaAfuCfgUfuAfcGfudTsdT	147	30
AM02341-AS	dTsUfsuCfaUfgAUNAaAfuCfgUfuAfcGfuCfsgscsuAu	130	28
AM02342-AS	dTsUfuCfaUfgAUNAaAfuCfgUfuAfcGfuCfsgscsuAu	134	28
AM02345-AS	dTsUfsuCfaUfgAfaUNAafuCfgUfuAfcGfuCfsgscsuAu	129	28
AM02346-AS	dTsUfuCfaUfgAfaUNAafuCfgUfuAfcGfuCfsgscsuAu	133	28
AM02508-AS	dTsUfsuCfaUfgAfaAfuCfgUfuAfcGfudTsdT	120	30
AM02509-AS	dTUfuCfaUfgAfaAfuCgUfuAfcGfudTsdT	140	30
AM02523-AS	dTsAfsaCfcAfcAfuAfcGfuUfgGfaGfudTsdT	117	8
AM02525-AS	dTsUfsgAfuAfaAfcAfcUfuAfaCfcCfadTsdT	119	26
AM02527-AS	dTsCfsaUfgAfaAfuCfgUfuAfcGfuUfgdTsdT	118	16
AM02529-AS	usCfsaUfgAfaAfuCfgUfuAfcGfuUfgdTsdT	148	35
AM02604-AS	dTsUfsuCfaUfgAfaAfuCgUfuAfcGfudTsdT	122	30
AM02605-AS	dTsUfsuCfaUfgAfaAfuCgUfuAfcGfudTsdT	124	30
AM02848-AS	dTsUfuCfaUfgAfaAfuCgUfuAfcGfudTsdT	132	30
AM02849-AS	dTsUfuCfaUfgAfaAfuCgUfuAfcGfudTsdT	131	30
AM02850-AS	dTsUfsuCfaUfgAfaAfuCgUfuAfcGfudTsdT	121	30
AM02998-AS	usUfsuCfaUfgAfaAfuCgUfuAfcGfudTsdT	160	40
AM03000-AS	usCfsuAfgCfaAfcAfaAfcCfuUfuAfadTsdT	151	36
AM03001-AS	usCfsuAfgCfaaCfaAfaAfcCfuUfuAfadTsdT	149	36
AM03002-AS	usCfsuAfgCfaAfcAfaAfaCfuUfuAfadTsdT	152	36
AM03003-AS	usCfsuAfgCfaaCfaAfaAfaCfuUfuAfadTsdT	150	36
AM03008-AS	usGfsuAfaAfaCfaAfuGfuUfaCfudTsdT	154	37
AM03009-AS	usGfsuAfaAfaCfaAfuUfgUfguaCfudTsdT	153	37
AM03059-AS	pdTsUfsuCfaUfgAfaAfuCgUfuAfcGfudTsdT	146	30
AM03465-AS	usUfsuCfaUfgAfaAfuCgUfuAfcGfusug	161	41
AM03513-AS	usUfsuCfaUfgAfaAfuCguuacgusug	162	41

AM03514-AS	usUfsuCfaUfgAfaaucguuacgusug	165	41
AM03517-AS	asUfsuCfaUfgAfaAfcGfusug	90	4
AM03685-AS	usUfsuCfaUfgAfaAfcGfusug	159	41
AM03688-AS	usUfsUfCfaugAfaAfcGfusug	167	41
AM03689-AS	usUfsuCfaUfgAfaaucgUfuacgusug	163	41
AM03690-AS	usUfsUfcaugAfaAfcGfusug	166	41
AM04001-AS	usGfsuAfaAfaCfaAfuugUfgUfaCfususu	155	38
AM04004-AS	asGfsuAfaAfaCfaAfuugUfgUfaCfususu	84	1
AM04007-AS	usGfsuAfaAfaCfaAfuugUfgUfaCfuusasa	156	39
AM04010-AS	asGfsuAfaAfaCfaAfuugUfgUfaCfuusasa	85	2
AM04015-AS	asGfsuAfaAfaCfaAfuugUfguaCfuusasa	83	2
AM04018-AS	asGfsuAfaAfaCfaauugUfguacuuusasa	86	2
AM04040-AS	vpusUfsuCfaUfgAfaAfcGfusug	168	41
AM04101-AS	asUfsuCfaUfgAfaaucgUfuacgusug	91	4
AM04102-AS	usUfsuCfaUfgAfaaucgUfuacguugsas(invT)	164	42
AM04103-AS	asUfsuCfaUfgAfaaucgUfuacguugsas(invT)	92	5
AM04104-AS	usUfsucaugAfaAfcGfusug	157	41
AM04105-AS	asUfsucaugAfaAfcGfusug	88	4
AM04106-AS	asUfsucaugAfaAfcGfusTMsGM	87	3
AM04244-AS	usUfsuCfaUfgaAfaucgUfuacgusug	158	41
AM04452-AS	asUfsuCfaUfgAfaaucgUfuAfcguugsasc	93	6
AM04455-AS	asUfsuCfaUfgaAfaucgUfuAfcguugsasc	89	6

Таблица 2В

Смысловые цепи РНК-триггера Hif2 α , содержащие модифицированные нуклеотиды

Идентиф. номер смысловой цепи	Последовательность смысловой цепи, 5' → 3'	SEQ ID NO.	SEQ ID NO. немодифицированной последовательности
AM00158-SS	CfuGfuCfaAfcGfuAfaCfGfuUfuAf(invT)	277	67
AM00188-SS	(NH2-C6)uAuUfgCfGfuAfaCfaCfaCfaAfgCfuCfcAf(invT)	265	79
AM00189-SS	(NH2-C6)uAuGfcUfaCfGfuCfcAfcCfcAfgUfaCfcAf(invT)	264	70
AM00190-SS	(NH2-C6)uAuCfuAfcCfuGfuCfaAfcGfuAfaCfGfuAf(invT)	263	65
AM00191-SS	(NH2-C6)uAuCfcUfgCfGfuAfaCfaCfaCfaAfgCfuAf(invT)	262	62
AM00207-SS	(NH2-C6)CfuGfcGfaAfcAfcAfaGfcUfcAf(invT)	258	66
AM00208-SS	(NH2-C6)GfcGfaAfcAfcAfaGfcUfcCfuAf(invT)	260	69
AM00209-SS	(NH2-C6)CfGfuAfaCfaCfaCfaAfgCfuCfcUfcAf(invT)	256	64
AM00210-SS	(NH2-C6)GfaAfcAfcAfaGfcUfcCfuCfuAf(invT)	259	68
AM00211-SS	(NH2-C6)CfaGfuGfcAfaCfGfuCfcAfcCfcAfgAf(invT)	253	61
AM00212-SS	(NH2-C6)AfaCfcCfuAfcCfuGfuCfaAfcGfuAf(invT)	247	45
AM00213-SS	(NH2-C6)AfcCfcUfaCfcUfgUfcAfaGfuUfaAf(invT)	248	48
AM00214-SS	(NH2-C6)UfcAfcUfgUfcAfaCfGfuAfaCfcGfuAf(invT)	266	78
AM00219-SS	(NH2-C6)AfcCfuGfuCfaAfcGfuAfaCfGfuAf(invT)	249	49
AM00220-SS	(NH2-C6)CfcUfgUfcAfaCfGfuAfaCfcGfuUfuAf(invT)	255	63

AM00221-SS (NH2-C6)UfgCfgAfaCfaCfaCfaAfgCfuCfcAf(invdt)	267	79
AM00222-SS (NH2-C6)GfcUfaCfcCfcAfcCfcAfgUfaCfcAf(invdt)	261	70
AM00223-SS (NH2-C6)CfuAfcCfuGfuCfaAfcGfuAfaCfcAf(invdt)	257	65
AM00224-SS (NH2-C6)CfcUfgCfgAfaCfaCfaCfaAfgCfuAf(invdt)	254	62
AM00366-SS (Alk-SS-C6)CfuGfcGfaAfcAfcAfaGfcUfcAf(invdt)	220	66
AM00367-SS (Alk-SS-C6)GfcGfaAfcAfcAfaGfcUfcCfuAf(invdt)	223	69
AM00369-SS (Alk-SS-C6)GfaAfcAfcAfcAfaGfcUfcCfuAf(invdt)	222	68
AM00530-SS (Alk-SS-C6)AfcCfcUfaCfcUfgUfcAfaGfgUfaAf(invdt)	212	48
AM00531-SS (Alk-SS-C6)UfcAfcUfgUfcAfaCfcUfaAfcGfaAf(invdt)	224	78
AM00543-SS (Alk-SS-C6)AfaCfcCfuAfcCfuGfuCfaAfcGfuAf(invdt)	211	45
AM00544-SS (Alk-SS-C6)AfcCfuGfuCfaAfcGfuAfaCfcUfaAf(invdt)	213	49
AM00545-SS (Alk-SS-C6)CfuAfcCfuGfuCfaAfcGfuAfaCfcAf(invdt)	219	65
AM01771-SS AfgUfaCfaCfaAfuUfgUfuUfaAfcAf(invdt)	271	56
AM01776-SS UfuAfaGfgUfuUfuGfuUfgCfuAfgAf(invdt)	284	82
AM01785-SS AfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(invdt)	269	51
AM01790-SS UfgUfaUfgGfgAfgCfuUfaAfcUfuAf(invdt)	283	81
AM01859-SS (Alk-SS-C6)AfgUfaCfaCfaAfuUfgUfuUfaAfcAf(invdt)	218	56
AM01860-SS (Alk-SS-C6)UfuAfaGfgUfuUfuGfuUfgCfuAfgAf(invdt)	226	82
AM01861-SS (Alk-SS-C6)CfuGfuCfaAfcGfuAfaCfcUfuUfuAf(invdt)	221	67
AM01862-SS (Alk-SS-C6)AfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(invdt)	215	51
AM01863-SS (Alk-SS-C6)UfgUfaUfgGfgAfgCfuUfaAfcUfuAf(invdt)	225	81
AM01994-SS (Alk-C6)uAuAfcCfuGfuCfaAfcGfuAfaCfcUfaAf(invdt)	169	71
AM02043-SS (Me-Alk-SS-C6)AfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(invdt)	231	51
AM02093-SS (DBCO-TEG)uAuAfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(invdt)	228	72
AM02135-SS (Alk-SS-C6)AfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(invdt)	216	51
AM02137-SS (Alk-SS-C6)AfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(invdt)	217	51
AM02139-SS (Alk-SS-C6)AfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(invdt)	214	51
AM02142-SS CfsasAfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(C6-SS-Alk-Me)	276	59
AM02144-SS CUNAsasAfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(C6-SS-Alk-Me)	278	59
AM02149-SS uAuAusCfsaAfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(C6-SS-Alk-Me)	280	75
AM02163-SS uAuAusCfsgAfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(C6-SS-Alk-Me)	282	76
AM02363-SS (DBCO-TEG)uAuAusCfsgAfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(invdt)	230	76
AM02364-SS uAuAusCfsgAfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(C6-SS-Alk-Me)	281	76
AM02365-SS uAuAusCfcAfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(C6-SS-Alk-Me)	279	76
AM02456-SS (Alk-SMPT-C6)AfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(invdt)	193	51
AM02510-SS (Me-Alk-SS-C6)AfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(invdt)	232	51
AM02512-SS (Me-Alk-SS-C6)AfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(invdt)	233	51
AM02522-SS (NH2-C6)AfcUfcCfaAfcGfuAfuGfuGfgUfuAf(invdt)	250	55
AM02524-SS (NH2-C6)UfgGfgUfuAfaGfuGfuUfuAfuCfaAf(invdt)	268	80
AM02526-SS (NH2-C6)CfaAfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAf(invdt)	252	60
AM02528-SS (NH2-C6)CfaAfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfg(invdt)	251	58
AM02546-SS (Me-Alk-SS-C6)AfcUfcCfaAfcGfuAfuGfuGfgUfuAf(invdt)	235	55
AM02547-SS (Me-Alk-SS-C6)UfgGfgUfuAfaGfuGfuUfuAfuCfaAf(invdt)	242	80
AM02548-SS (Me-Alk-SS-C6)CfaAfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAf(invdt)	241	60
AM02549-SS (Me-Alk-SS-C6)CfaAfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfg(invdt)	240	58
AM02852-SS AfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(C6-SS-Alk-Me)	272	50
AM02853-SS AfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(C6-SS-Alk-Me)	273	50
AM02856-SS (Me-Alk-SS-C6)AfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(invdt)	234	51
AM02999-SS (DBCO-TEG)uAuAfcGfuAfaCfcAfuUfuCfaUfgAfaAf(invdt)	229	72
AM03004-SS (Me-Alk-SS-C6)UfuAfaGfgUfuUfuGfuUfgCfuAfgAf(invdt)	244	82
AM03005-SS (Me-Alk-SS-C6)uuAfaGfgUfuUfuguUfgCfuAfga(invdt)	246	82
AM03006-SS (Me-Alk-SS-C6)UfuAfaGfgUfuUfuGfuUfgCfuAfgAf(invdt)	243	82
AM03007-SS (Me-Alk-SS-C6)uuAfaGfgUfuUfuguUfgCfuAfga(invdt)	245	82
AM03010-SS (Me-Alk-SS-C6)AfgUfaCfcAfaAfuUfgUfuUfaAfcAf(invdt)	236	56

AM03011-SS (Me-Alk-SS-C6)agUfaCfacAfaFuUfgUfuuuAfa(invdt)	238	56
AM03012-SS (Me-Alk-SS-C6)AfgUfaCfaAfaFuUfgUfuUfuAfa(invdt)	237	56
AM03013-SS (Me-Alk-SS-C6)agUfaCfaAfaFuUfgUfuuuAfa(invdt)	239	56
AM03058-SS AfcGfuAfaCfGfAfuUfuCfaUfgAfaAf(invdt)	270	51
AM03307-SS agUfaCfaAfaFuUfgUfuuuAfa(invdt)	274	56
AM03308-SS (Alk-C6-C6)AfcGfuAfaCfGfAfuUfuCfaUfgAfaAf(invdt)	170	51
AM03467-SS (Alk-SMPT-C6)AfcGfuAfaCfGfAfuUfuCfaUfgAfaa(invdt)	194	51
AM03469-SS (Alk-SMPT-C6)ascGfuAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	201	51
AM03471-SS (Alk-SMPT-C6)ascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	208	51
AM03473-SS (Alk-SMPT-C6)ascGfuAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	200	51
AM03475-SS (Alk-SMPT-C6)ascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	204	51
AM03516-SS (Alk-SMPT-C6)ascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	203	51
AM03519-SS (Alk-SMPT-C6)ascGfuAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	202	54
AM03687-SS (Alk-SMPT-C6)ascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	205	51
AM03692-SS (Alk-PEG5-C6)uAuascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	185	72
AM03694-SS (Alk-PEG5-C6)uAuascGfuAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	183	73
AM03708-SS (Alk-PEG5-C6)uAuascGfuAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	182	72
AM03710-SS (Alk-PEG5-C6)uAuascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	189	72
AM03712-SS (Alk-PEG5-C6)uAuascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	190	73
(Alk-PEG5-C6)(Alk-PEG5-Ser)- AM03714-SS uAuascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	180	72
AM03774-SS (Alk-C6-SMPT-C6)ascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	174	51
AM03829-SS (Alk-PEG5-C6)uAuascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	184	72
AM03830-SS (Chol-TEG)uAuascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	227	72
AM03831-SS ascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(NAG13)	275	50
AM04003-SS (Alk-SMPT-C6)asgUfaCfaCfaAfaFuUfgUfuuuAfa(invdt)	209	56
AM04006-SS (Alk-SMPT-C6)asgUfaCfaCfaAfaFuUfgUfuuuAfa(invdt)	210	57
AM04009-SS (Alk-SMPT-C6)asaAfgUfaCfaCfaAfaFuUfgUfuuuAfa(invdt)	195	43
AM04012-SS (Alk-SMPT-C6)asaAfgUfaCfaCfaAfaFuUfgUfuuuAfa(invdt)	196	44
AM04014-SS (Alk-SMPT-C6)asaaguaCfaCfaAfaFuUfgUfuuuAfa(invdt)	198	44
AM04017-SS (Alk-SMPT-C6)asaagUfaCfaCfaAfaFuUfgUfuuuAfa(invdt)	199	44
AM04020-SS (Alk-SMPT-C6)asaaguAfaCfaCfaAfaFuUfgUfuuuAfa(invdt)	197	44
AM04107-SS (Alk-C6-SMPT-C6)ascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	175	51
AM04107-SS (Alk-C6-SMPT-C6)ascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	175	51
AM04109-SS (Alk-C6-SMPT-C6)ascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	176	52
(Alk-C6-SMPT- AM04111-SS C6)AMsCMguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	171	52
AM04113-SS (Alk-C6-SMPT-C6)ascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	178	54
AM04115-SS (Alk-C6-SMPT-C6)ascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invAb)	177	53
AM04117-SS (Alk-C6-SMPT-C6)ascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	179	54
AM04119-SS (Alk-C6-SMPT-C6)asaguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	173	47
AM04121-SS (Alk-C6-SMPT-C6)asaguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	172	46
AM04122-SS (Alk-PEG5-C6)ascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	181	51
AM04241-SS (Alk-SMPT-C6)ascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	206	51
AM04243-SS (Alk-SMPT-C6)ascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	207	51
AM04246-SS (Alk-PEG5-C6)uAuascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	186	72
AM04248-SS (Alk-PEG5-C6)uAuascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	187	72
AM04451-SS (Alk-PEG5-C6)uAuascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	188	74
(Alk-PEG5- AM04454-SS C6)uAuascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	192	77
AM04457-SS (Alk-PEG5-C6)uAuascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	191	77
AM03710-SS (Alk-PEG5-C6)uAuascguAfaCfGfAfuuuCfaUfgAfaa(invdt)	189	72

Таблица 3

Дуплексы РНК-триггера Hif2 α с идентификационными номерами дуплексов

Идентиф. номер дуплекса	Идентиф. номер антисмысловой цепи	SEQ ID NO.	SEQ ID NO. немодифицированной последовательности	Идентиф. номер смысловой цепи	SEQ ID NO.	SEQ ID NO. немодифицированной последовательности
AD0008-6	AM00159-AS	112	21	AM00188-SS	265	79
AD0008-7	AM00160-AS	113	22	AM00189-SS	264	70
AD0008-8	AM00161-AS	106	17	AM00190-SS	263	65
AD0008-9	AM00162-AS	103	13	AM00191-SS	262	62
AD0010-2	AM00163-AS	110	19	AM00207-SS	258	66
AD0010-3	AM00164-AS	104	14	AM00208-SS	260	69
AD0010-4	AM00165-AS	111	20	AM00209-SS	256	64
AD0010-5	AM00166-AS	102	12	AM00210-SS	259	68
AD0010-6	AM00167-AS	137	27	AM00211-SS	253	61
AD0010-7	AM00168-AS	101	11	AM00212-SS	247	45
AD0010-8	AM00169-AS	135	24	AM00213-SS	248	48
AD0010-9	AM00170-AS	136	25	AM00214-SS	266	78
AD0011-0	AM00171-AS	105	15	AM00219-SS	249	49
AD0011-1	AM00172-AS	100	10	AM00220-SS	255	63
AD0011-2	AM00159-AS	112	21	AM00221-SS	267	79
AD0011-3	AM00160-AS	113	22	AM00222-SS	261	70
AD0011-4	AM00161-AS	106	17	AM00223-SS	257	65
AD0011-5	AM00162-AS	103	13	AM00224-SS	254	62
AD0021-5	AM00163-AS	110	19	AM00369-SS	222	68
AD0026-8	AM00166-AS	102	12	AM00369-SS	222	68
AD0026-9	AM00169-AS	135	24	AM00530-SS	212	48
AD0027-0	AM00170-AS	136	25	AM00531-SS	224	78
AD0027-4	AM00168-AS	101	11	AM00543-SS	211	45
AD0027-5	AM00171-AS	105	15	AM00544-SS	213	49
AD0027-6	AM00161-AS	106	17	AM00545-SS	219	65
AD0028-5	AM00163-AS	110	19	AM00366-SS	220	66
AD0028-6	AM00164-AS	104	14	AM00367-SS	223	69
AD0037-3	AM00169-AS	135	24	AM00659-SS	212	48

AD0037 4	AM00170- AS	136	25	AM00660- SS	224	78
AD0037 5	AM00168- AS	101	11	AM00679- SS	211	45
AD0037 6	AM00171- AS	105	15	AM00661- SS	213	49
AD0037 7	AM00161- AS	106	17	AM00662- SS	219	65
AD0098 8	AM01772- AS	116	23	AM01771- SS	271	56
AD0098 9	AM01777- AS	109	18	AM01776- SS	284	82
AD0099 0	AM01782- AS	96	7	AM00158- SS	277	67
AD0099 1	AM01786- AS	145	30	AM01785- SS	269	51
AD0099 2	AM01791- AS	99	9	AM01790- SS	283	81
AD0099 3	AM01773- AS	115	23	AM01771- SS	271	56
AD0099 4	AM01778- AS	108	18	AM01776- SS	284	82
AD0099 5	AM01783- AS	95	7	AM00158- SS	277	67
AD0099 6	AM01787- AS	144	30	AM01785- SS	269	51
AD0099 7	AM01792- AS	98	9	AM01790- SS	283	81
AD0102 0	AM01772- AS	116	23	AM01859- SS	218	56
AD0102 1	AM01773- AS	115	23	AM01859- SS	218	56
AD0102 2	AM01770- AS	114	23	AM01859- SS	218	56
AD0102 3	AM01777- AS	109	18	AM01860- SS	226	82
AD0102 4	AM01778- AS	108	18	AM01860- SS	226	82
AD0102 5	AM01775- AS	107	18	AM01860- SS	226	82
AD0102 6	AM01782- AS	96	7	AM01861- SS	221	67
AD0102 7	AM01783- AS	95	7	AM01861- SS	221	67
AD0102 8	AM01780- AS	94	7	AM01861- SS	221	67
AD0102 9	AM01786- AS	145	30	AM01862- SS	215	51
AD0103 0	AM01787- AS	144	30	AM01862- SS	215	51
AD0103 1	AM01784- AS	138	30	AM01862- SS	215	51
AD0103 2	AM01791- AS	99	9	AM01863- SS	225	81

AD0103 3	AM01792- AS	98	9	AM01863- SS	225	81
AD0103 4	AM01789- AS	97	9	AM01863- SS	225	81
AD0118 0	AM00171- AS	105	15	AM01994- SS	169	71
AD0121 4	AM01784- AS	138	30	AM02043- SS	231	51
AD0125 5	AM01784- AS	138	30	AM02093- SS	228	72
AD0125 6	AM02090- AS	143	30	AM01862- SS	215	51
AD0125 7	AM02091- AS	142	30	AM01862- SS	215	51
AD0125 8	AM02092- AS	139	30	AM01862- SS	215	51
AD0128 8	AM02133- AS	141	30	AM02135- SS	216	51
AD0128 9	AM01784- AS	138	30	AM02137- SS	217	51
AD0129 0	AM01784- AS	138	30	AM02139- SS	214	51
AD0129 1	AM02140- AS	128	31	AM02142- SS	276	59
AD0129 2	AM02140- AS	128	31	AM02144- SS	278	59
AD0129 3	AM02145- AS	127	33	AM02149- SS	280	75
AD0129 4	AM02146- AS	123	29	AM02163- SS	282	76
AD0129 5	AM02147- AS	126	32	AM02149- SS	280	75
AD0129 6	AM02150- AS	125	34	AM02149- SS	280	75
AD0139 1	AM01784- AS	138	30	AM01785- SS	269	51
AD0139 2	AM02327- AS	147	30	AM01785- SS	269	51
AD0140 4	AM02341- AS	130	28	AM02364- SS	281	76
AD0140 5	AM02341- AS	130	28	AM02365- SS	279	76
AD0140 6	AM02342- AS	134	28	AM02364- SS	281	76
AD0140 7	AM02342- AS	134	28	AM02365- SS	279	76
AD0140 8	AM02345- AS	129	28	AM02364- SS	281	76
AD0140 9	AM02345- AS	129	28	AM02365- SS	279	76
AD0141 0	AM02346- AS	133	28	AM02364- SS	281	76
AD0141 1	AM02346- AS	133	28	AM02365- SS	279	76

AD0142	AM02345-4	AS	129	28	AM02363-SS	230	76
AD0147	AM01784-6	AS	138	30	AM02456-SS	193	51
AD0152	AM02133-2	AS	141	30	AM02510-SS	232	51
AD0152	AM02509-3	AS	140	30	AM02512-SS	233	51
AD0152	AM02508-4	AS	120	30	AM02043-SS	231	51
AD0152	AM02523-5	AS	117	8	AM02522-SS	250	55
AD0152	AM02525-6	AS	119	26	AM02524-SS	268	80
AD0152	AM02527-7	AS	118	16	AM02526-SS	252	60
AD0152	AM02529-8	AS	148	35	AM02528-SS	251	58
AD0154	AM02523-6	AS	117	8	AM02546-SS	235	55
AD0154	AM02525-7	AS	119	26	AM02547-SS	242	80
AD0154	AM02527-8	AS	118	16	AM02548-SS	241	60
AD0154	AM02529-9	AS	148	35	AM02549-SS	240	58
AD0155	AM02604-4	AS	122	30	AM02512-SS	233	51
AD0155	AM02605-5	AS	124	30	AM02510-SS	232	51
AD0165	AM02848-4	AS	132	30	AM02852-SS	272	50
AD0165	AM02848-5	AS	132	30	AM02512-SS	233	51
AD0165	AM02849-6	AS	131	30	AM02853-SS	273	50
AD0165	AM02849-7	AS	131	30	AM02856-SS	234	51
AD0165	AM02850-8	AS	121	30	AM02853-SS	273	50
AD0165	AM02850-9	AS	121	30	AM02856-SS	234	51
AD0188	AM02998-4	AS	160	40	AM02510-SS	232	51
AD0188	AM02998-5	AS	160	40	AM02999-SS	229	72
AD0188	AM03000-6	AS	151	36	AM03004-SS	244	82
AD0188	AM03001-7	AS	149	36	AM03005-SS	246	82
AD0188	AM03002-8	AS	152	36	AM03006-SS	243	82
AD0188	AM03003-9	AS	150	36	AM03007-SS	245	82

AD0189 0	AM03008- AS	154	37	AM03010- SS	236	56
AD0189 1	AM03008- AS	154	37	AM03011- SS	238	56
AD0189 2	AM03009- AS	153	37	AM03012- SS	237	56
AD0189 3	AM03009- AS	153	37	AM03013- SS	239	56
AD0191 0	AM02605- AS	124	30	AM03058- SS	270	51
AD0191 1	AM03059- AS	146	30	AM03058- SS	270	51
AD0207 3	AM03009- AS	153	37	AM03307- SS	274	56
AD0207 4	AM02605- AS	124	30	AM03308- SS	170	51
AD0269 1	AM03465- AS	161	41	AM03467- SS	194	51
AD0269 2	AM03465- AS	161	41	AM03469- SS	201	51
AD0269 3	AM03465- AS	161	41	AM03471- SS	208	51
AD0269 4	AM03465- AS	161	41	AM03473- SS	200	51
AD0269 5	AM03465- AS	161	41	AM03475- SS	204	51
AD0273 3	AM03513- AS	162	41	AM03516- SS	203	51
AD0273 4	AM03514- AS	165	41	AM03516- SS	203	51
AD0273 5	AM03517- AS	90	4	AM03519- SS	202	54
AD0285 7	AM03685- AS	159	41	AM03687- SS	205	51
AD0285 8	AM03688- AS	167	41	AM03687- SS	205	51
AD0285 9	AM03689- AS	163	41	AM03687- SS	205	51
AD0286 0	AM03690- AS	166	41	AM03687- SS	205	51
AD0286 1	AM03685- AS	159	41	AM03692- SS	185	72
AD0286 2	AM03517- AS	90	4	AM03694- SS	183	73
AD0287 3	AM03465- AS	161	41	AM03708- SS	182	72
AD0287 4	AM03465- AS	161	41	AM03710- SS	189	72
AD0287 5	AM03517- AS	90	4	AM03712- SS	190	73
AD0287 6	AM03465- AS	161	41	AM03714- SS	180	72
AD0294 9	AM03465- AS	161	41	AM03774- SS	174	51

AD0301	AM03465-	161	41	AM03829-	184	72
1	AS			SS		
AD0301	AM03465-	161	41	AM03830-	227	72
2	AS			SS		
AD0301	AM03465-	161	41	AM03831-	275	50
3	AS			SS		
AD0318	AM04001-	155	38	AM04003-	209	56
7	AS			SS		
AD0318	AM04004-	84	1	AM04006-	210	57
8	AS			SS		
AD0318	AM04007-	156	39	AM04009-	195	43
9	AS			SS		
AD0319	AM04010-	85	2	AM04012-	196	44
0	AS			SS		
AD0319	AM04010-	85	2	AM04014-	198	44
1	AS			SS		
AD0319	AM04015-	83	2	AM04017-	199	44
2	AS			SS		
AD0319	AM04018-	86	2	AM04020-	197	44
3	AS			SS		
AD0321	AM04040-	168	41	AM03469-	201	51
5	AS			SS		
AD0321	AM04040-	168	41	AM03475-	204	51
6	AS			SS		
AD0325	AM03689-	163	41	AM04107-	175	51
3	AS			SS		
AD0325	AM04101-	91	4	AM04117-	179	54
4	AS			SS		
AD0325	AM04102-	164	42	AM04121-	172	46
5	AS			SS		
AD0325	AM04103-	92	5	AM04119-	173	47
6	AS			SS		
AD0325	AM04104-	157	41	AM04107-	175	51
7	AS			SS		
AD0325	AM04105-	88	4	AM04117-	179	54
8	AS			SS		
AD0325	AM04106-	87	3	AM04109-	176	52
9	AS			SS		
AD0326	AM04105-	88	4	AM04109-	176	52
0	AS			SS		
AD0326	AM04105-	88	4	AM04111-	171	52
1	AS			SS		
AD0326	AM04105-	88	4	AM04113-	178	54
2	AS			SS		
AD0326	AM04105-	88	4	AM04115-	177	53
3	AS			SS		
AD0326	AM03690-	166	41	AM04107-	175	51
4	AS			SS		
AD0326	AM03689-	163	41	AM03692-	185	72
5	AS			SS		
AD0326	AM03689-	163	41	AM04122-	181	51
6	AS			SS		
AD0334	AM03689-	163	41	AM04241-	206	51
5	AS			SS		
AD0334	AM03689-	163	41	AM04243-	207	51
6	AS			SS		
AD0334	AM04244-	158	41	AM04243-	207	51
7	AS			SS		
AD0334	AM03689-	163	41	AM04246-	186	72
8	AS			SS		
AD0334	AM03689-	163	41	AM04248-	187	72
9	AS			SS		
AD0350	AM04101-	91	4	AM04451-	188	74
5	AS			SS		
AD0350	AM04452-	93	6	AM04454-	192	77
6	AS			SS		
AD0350	AM04455-	89	6	AM04454-	192	77
7	AS			SS		
AD0350	AM04452-	93	6	AM04457-	191	77
8	AS			SS		

Смысловую цепь, содержащую последовательность, приведенную в табл. 2В, можно гибридизовать с любой антисмысловой цепью, содержащей последовательность, приведенную в табл. 2А, при условии, что две последовательности содержат область, комплементарную по меньшей мере на 90%, в пределах

оснований нуклеотидов 1-19 SEQ ID NO: 56.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α содержит антисмысловую цепь, содержащую последовательность нуклеотидных оснований SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α содержит антисмысловую цепь, содержащую последовательность нуклеотидных оснований SEQ ID NO: 156, и смысловую цепь, содержащую последовательность нуклеотидных оснований SEQ ID NO: 195. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α содержит антисмысловую цепь, содержащую последовательность нуклеотидных оснований SEQ ID NO: 86, и смысловую цепь, содержащую последовательность нуклеотидных оснований SEQ ID NO: 197. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α содержит антисмысловую цепь, содержащую последовательность нуклеотидных оснований SEQ ID NO: 155, и смысловую цепь, содержащую последовательность нуклеотидных оснований SEQ ID NO: 209.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α содержит антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α содержит антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 156, и смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 195. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α содержит антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 86, и смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 197. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α содержит антисмысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 155, и смысловую цепь, содержащую SEQ ID NO: 209.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α содержит нацеливающую группу, связывающую группу, полимер для доставки, носитель для доставки и/или другую группу, отличную от нуклеотида, или конъюгирован с указанными группами. Нацеливающая группа, связывающая группа, полимер для доставки, носитель для доставки и/или другая группа, отличная от нуклеотида, может быть ковалентным способом связана с 3'- и/или 5'-концом смысловой цепи и/или антисмысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α может содержать нацеливающую группу, связывающую группу, полимер для доставки, носитель для доставки или другую группу, отличную от нуклеотида, связанную с 3'- и/или 5'-концом смысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающая группа, связывающая группа, полимер для доставки, носитель для доставки или другая группа, отличная от нуклеотида, связана с 5'-концом смысловой цепи РНК-триггера Hif2 α . Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающая группа, связывающая группа, полимер для доставки, носитель для доставки или другая группа, отличная от нуклеотида, связана напрямую или опосредованно с триггером линкером/связывающей группой. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающая группа, связывающая группа, полимер для доставки, носитель для доставки и/или другая группа, отличная от нуклеотида, связана с триггером лабильной, расщепляемой или обратимой связью или линкером.

Нацеливающая группа может усиливать фармакокинетические свойства или свойства биораспределения РНК-триггера или конъюгата, к которому присоединена данная нацеливающая группа, для улучшения клетко- или тканеспецифичного распределения и клеткоспецифичного поглощения конъюгата. В некоторых случаях связывание нацеливающей группы с клеткой или рецептором клетки может вызывать эндоцитоз. Нацеливающая группа может являться одновалентной, двухвалентной, трехвалентной, четырехвалентной или обладать большей валентностью. Иллюстративные нацеливающие группы включают, без ограничения, соединения, обладающие аффинностью к молекуле поверхности клетки, лиганды рецептора клетки, гаптен, антитела, моноклональные антитела, фрагменты антител и миметики антител, обладающие аффинностью к молекулам поверхности клетки.

Можно синтезировать молекулы РНК-триггера, описанные в настоящей заявке, содержащие реактивную группу, такую как аминная группа, на 5'-конце. Реактивную группу можно использовать для последовательного присоединения нацеливающего фрагмента с применением способов, принятых в данной области техники.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α содержит связывающую группу, конъюгированную с триггером. Связывающая группа облегчает ковалентное связывание триггера с нацеливающей группой или с полимером для доставки или носителем для доставки. Связывающая группа может быть присоединена к 3'- или 5'-концу смысловой цепи или антисмысловой цепи РНК-триггера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающая группа связана со смысловой цепью РНК-триггера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающая группа конъюгирована с 5'- или 3'-концом смысловой цепи РНК-триггера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающая группа конъюгирована с 5'-концом смысловой цепи РНК-триггера. Примеры связывающих групп включают, но не ограничены указанными: Alk-SMPT-C6, Alk-SS-C6, DBCO-TEG, Me-Alk-SS-C6 и C6-SS-Alk-Me, реактивные

группы, такие как первичные амины и алкины, алкильные группы, рибозу с удаленным азотистым основанием, рибитол и/или группы PEG.

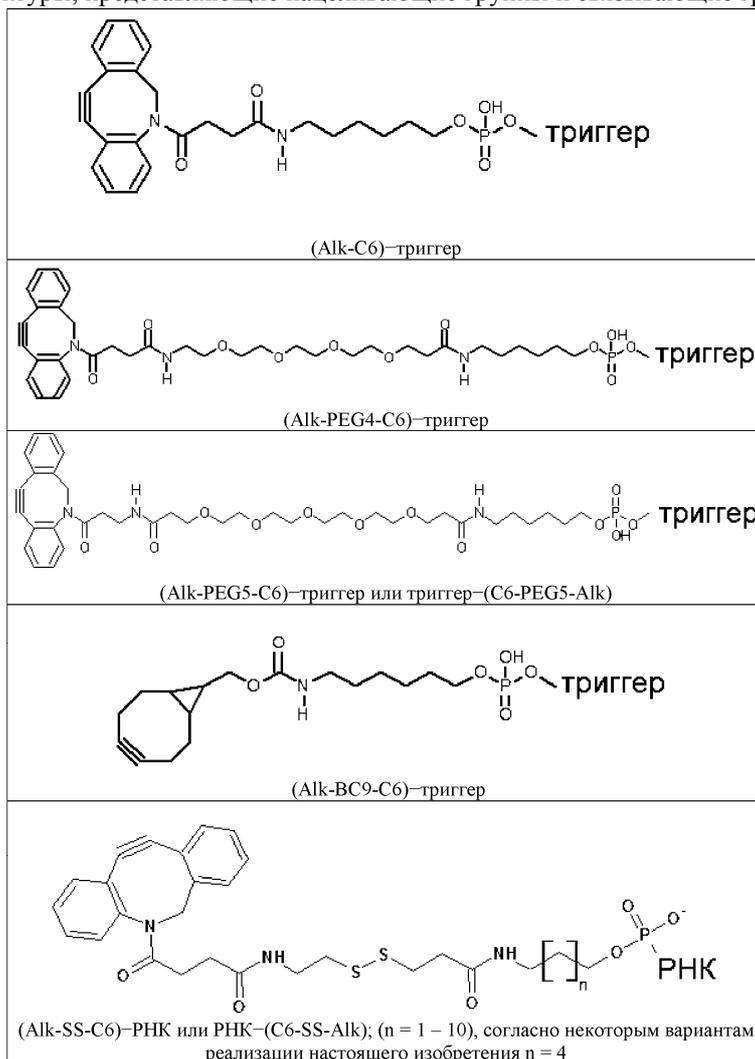
Линкер или связывающая группа представляет собой соединение между двумя атомами, которое связывает одну химическую группу (такую как РНК-триггер) или сегмент, представляющий интерес, с другой химической группой (такой как нацеливающая группа или полимер для доставки) или сегментом, представляющим интерес, одной или более ковалентными связями. Лабильное соединение содержит лабильную связь. Связь может необязательно включать спейсер, который увеличивает расстояние между двумя соединенными атомами. Спейсер может также добавить подвижности и/или длины связи. Спейсеры могут включать, но не ограничены указанными, алкильные группы, алкенильные группы, алкинильные группы, арильные группы, аралкильные группы, аралкенильные группы и аралкинильные группы, каждая из которых может содержать один или более гетероатомов, гетероциклов, аминокислот, нуклеотидов и сахаридов. Спейсерные группы хорошо известны в данной области техники, и приведенный выше перечень не предназначен для ограничения объема описания.

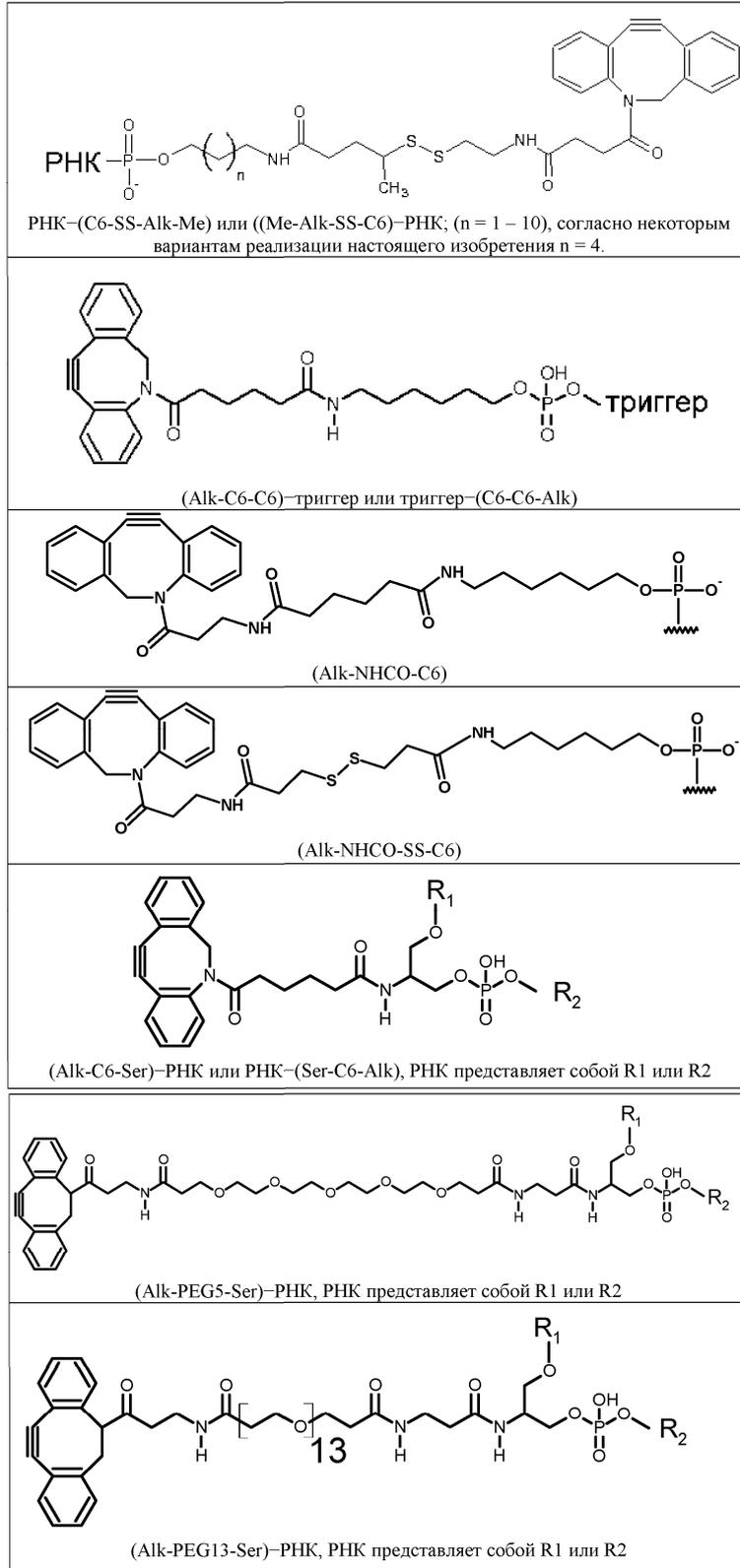
Нацеливающие группы и связывающие группы включают, но не ограничены указанными, (Alk-C6), (Alk-C6-C6), (Alk-C6-SMPT-C6), (Alk-PEG5-C6), (Alk-PEG5-C6)(Alk-PEG5-Ser), (Alk-SMPT-C6), (Alk-SS-C6), (C6-SS-Alk-Me), (Chol-TEG), (DBCO-TEG), (Me-Alk-SS-C6), (NAG13), (NH2-C6). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения любая из смысловых цепей РНК-триггера Hif2 α , приведенных в табл. 2В, которая содержит 3'- или 5'-нацеливающую группу или связывающую группу, может в качестве альтернативы не содержать 3'- или 5'-нацеливающую группу или связывающую группу или может содержать отличную 3'-или 5'-нацеливающую группу или связывающую группу, включая, но не ограничиваясь указанными, таковые, представленные в табл. 4.

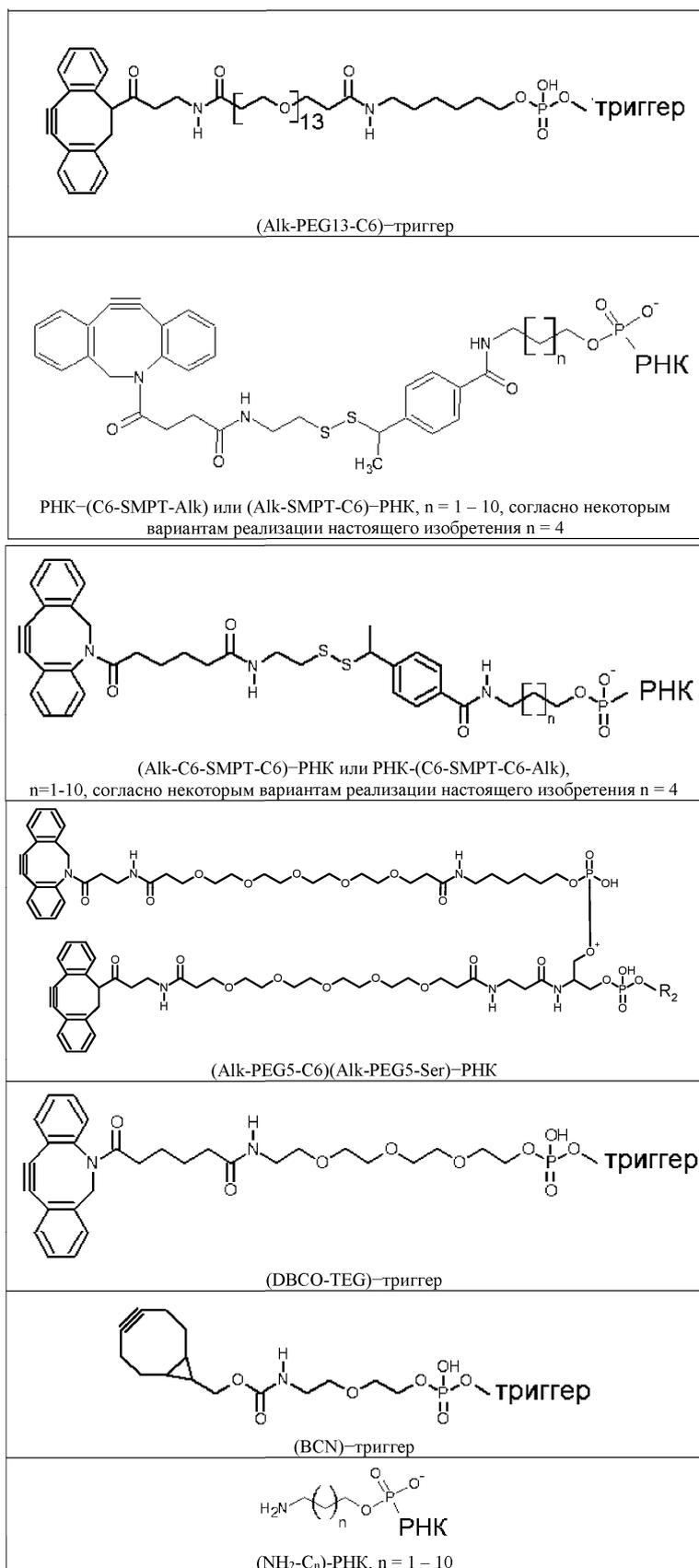
В структурах некоторых нацеливающих групп и связывающих групп, представленных в табл. 4, РНК-триггер показан и обозначен как триггер, РНК, R, или R1, или R2 (т.е. каждый триггер, РНК, или R1, или R2 содержит РНК-триггер). Например, в отношении (Alk-C6-Ser), (Alk-PEG5-Ser) и (Alk-PEG13-Ser) один из R1 и R2 содержит РНК-триггер и второй может представлять собой водород.

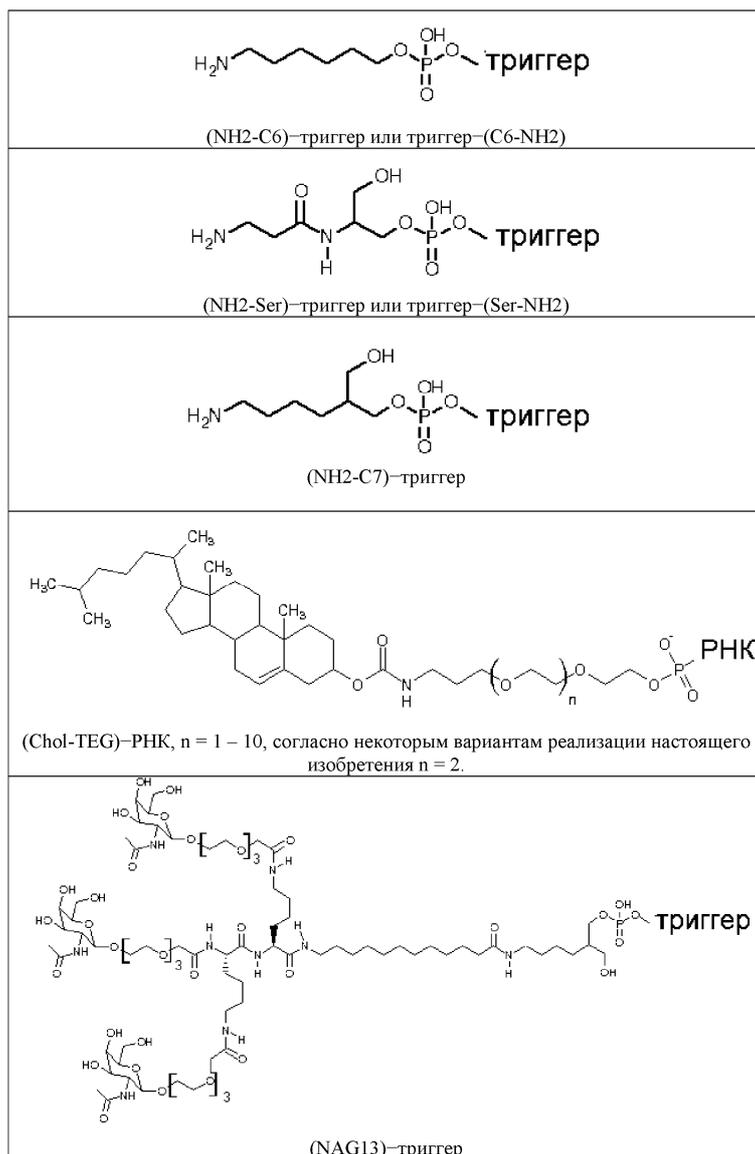
Таблица 4

Структуры, представляющие нацеливающие группы и связывающие группы









Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения носитель для доставки можно использовать для доставки РНК-триггера в клетку или ткань. Носитель для доставки представляет собой соединение, которое улучшает доставку РНК-триггера в клетку или ткань. Носитель для доставки может содержать, не ограничиваясь указанными, полимер, такой как амфипатический полимер, мембраноактивный полимер, пептид, пептид мелиттин, мелиттин-подобный пептид, липид, обратимо модифицированный полимер или пептид либо обратимо модифицированный мембраноактивный полиамин, или может состоять из указанных полимеров.

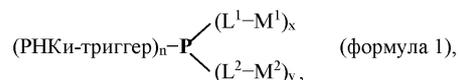
Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггеры могут быть объединены с липидами, наночастицами, полимерами, липосомами, мицеллами, DPC или другими системами для доставки, доступными в данной области техники. РНК-триггеры могут также быть конъюгированы химическим способом с нацеливающими группами, липидами (включая, но не ограничиваясь указанными, холестерол и производные холестерола), наночастицами, полимерами, липосомами, мицеллами, DPC (см., например, публикации WO 2000/053722, WO 2008/0022309, WO 2011/104169 и WO 2012/083185, WO 2013/032829, WO 2013/158141, каждая из которых включена в настоящую заявку посредством ссылки) или другими системами для доставки, доступными в данной области техники.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описаны фармацевтические композиции для доставки РНК-триггера Hif2 α в опухолевую клетку *in vivo*. Такие фармацевтические композиции могут содержать, не ограничиваясь указанными, РНК-триггер Hif2 α , конъюгированный с полимером для доставки, и получения конъюгата РНК-триггера с полимером для доставки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полимер для доставки представляет собой мембраноактивный полиамин. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полимер для доставки представляет собой обратимо модифицированный мембраноактивный полиамин.

Конъюгаты РНК-триггера Hif2 α с полимером для доставки.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описаны композиции, пред-

ставленные формулой



где РНКи-триггер представляет собой РНКи-триггер Hif2 α , описанный в настоящей заявке,

P представляет собой мембраноактивный полиамин,

M¹ содержит нацеливающую группу, связанную с P обратимой физиологически лабильной связью L¹, и

M² содержит стерический стабилизатор, присоединенный к P обратимой физиологически лабильной связью L²,

x является большим, чем 1,

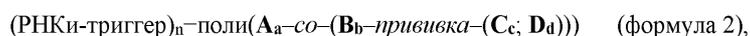
y является большим или равным 0.

(M²-L²)_y-P-(L¹-M¹)_x не является мембраноактивным. В настоящей заявке (M²-L²)_y-P-(L¹-M¹)_x относится к полимеру для доставки. Отщепление (L¹-M¹) и (M²-L²) возвращает P в мембраноактивное состояние. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения значение x+y составляет более 80%, более 90% или более 95% от количества первичных аминов P. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения значение x+y составляет более 80%, более 90% или более 95% от количества первичных аминов в популяции P. Значение n может составлять от 0,25 до 5 (от одного (1) РНКи-триггера на каждые 4 полимера до 5 РНКи-триггеров на полимер). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения значение n составляет от 0,5 до 5. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения n составляет 0,5-2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения n составляет 0,8-1,6. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения x составляет 1-20, 2-20, 3-20, 4-20, 5-20, 6-20, 7-20, 8-20, 9-20, 10-20, 11-20, 12-20, 13-20, 14-20 или 15-20.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения M¹ содержит интегринсвязывающее соединение. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения интегринсвязывающее соединение включает $\alpha_v\beta_3$ -связывающее соединение. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения интегринсвязывающее соединение включает лиганд RGD. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения $\alpha_v\beta_3$ -связывающее соединение включает лиганд RGD. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лиганд RGD включает миметик RGD. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения стерический стабилизатор включает полиэтиленгликоль (PEG). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отщепление L¹ и/или L² восстанавливает немодифицированный амин в P.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения (L¹-M¹) и (L²-M²) независимо представляют собой тетрапептидные модифицирующие агенты и/или дипептидные модифицирующие агенты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения L¹ и L² независимо представляют собой тетрапептидные связи или дипептид-РАВС (p-аминобензил-карбаматные) связи. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения L¹ и L² представляют собой тетрапептидные связи. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения L¹ и L² представляют собой дипептид-РАВС связи. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения L¹ представляет собой дипептид-РАВС связь и L² представляет собой тетрапептидную связь. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения L¹ представляет собой тетрапептидную связь и L² представляет собой дипептид-РАВС связь. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения тетрапептидная связь представляет собой тетрапептидную связь FCitFP (фенилаланин-цитруллин-фенилаланин-пролин). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дипептид-РАВС связь представляет собой ACit-РАВС связь. Для x=2 или более все L¹ могут представлять собой тетрапептидные связи, дипептид-РАВС связи или комбинацию тетрапептидных связей и дипептид-РАВС связей. Для y=2 или более все L² могут представлять собой тетрапептидные связи, дипептид-РАВС связи или комбинацию тетрапептидных связей и дипептид-РАВС связей.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описанный РНКи-триггер Hif2 α конъюгирован с обратимо модифицированным мембраноактивным полиамином для получения конъюгата РНКи-триггера с полимером для доставки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конъюгат РНКи-триггера с полимером для доставки содержит формулу, представленную ниже,



где A представляет собой мономерное звено, содержащее гидрофобную группу,

B представляет собой мономерное звено, содержащее первичный амин,

C содержит интегринсвязывающий лиганд, связанный (т.е. привитый) с содержащим первичный амин мономерным звеном обратимой физиологически лабильной связью,

D содержит стерический стабилизатор, связанный (т.е. привитый) с содержащим первичный амин мономерным звеном обратимой физиологически лабильной связью,

a представляет собой целое число больше нуля,
 b представляет собой целое число, большее или равное двум,
 c представляет собой целое число, большее или равное единице,
 d представляет собой целое число, большее или равное единице,
 значение $c+d$ составляет более 80%, более 85%, более 90% или более 95% от значения b,
 поли(A_a -со- B_b) представляет собой сополимер мембраноактивного полиамина, содержащий моно-
 мерные звенья А и В РНКи-триггер содержит РНКи-триггер Hif2 α , описанный в настоящей заявке, и
 n принимает значение от 0,25 (т.е. конъюгированный исключительно с одним из каждых четырех
 полимеров для доставки) до 5,0.

Поли(A_a -со-(B_b -прививка-(C_c ; D_d))) не является мембраноактивным. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения интегринсвязывающее соединение включает $\alpha v\beta 3$ -связывающее соединение. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения интегринсвязывающее соединение включает лиганд RGD, такой как миметик RGD. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения $\alpha v\beta 3$ -связывающее соединение включает лиганд RGD, такой как миметик RGD. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения стерический стабилизатор включает полиэтиленгликоль (PEG). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PEG содержит от 2 до 25 единиц этиленгликоля. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения с представляет собой любое целое число в диапазоне 1-75, 1-50, 5-50, 5-40, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 10-35, 10-30, 10-25, 10-20 или 15-20. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения p принимает значение от 0,5 до 2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение А:В (т.е. a:b) составляет от 30:70 до 60:40. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение А:В составляет от 60:40 до 40:60. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение А:В составляет приблизительно 45 \pm 5:55 \pm 5. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение А:В составляет приблизительно 44:56. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отношение А:В составляет приблизительно 46:54. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекулярная масса (ММ) полимера составляет 30-70 кДа. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения ММ полимера составляет 40-60 кДа. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения ММ полимера составляет 40-50 кДа. Согласно еще одним вариантам реализации настоящего изобретения ММ полимера составляет от приблизительно 43 кДа до приблизительно 48 кДа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полимер характеризуется индексом полидисперсности (PDI) менее 1,4, менее 1,3, 1,25, менее 1,2, менее 1,15 или менее 1,1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полимер содержит концевую азидную группу для присоединения РНКи-триггера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения p представляет собой 0,8-1,6. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения p представляет собой 1 \pm 0,5. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения с представляет собой 1-20, 2-20, 3-20, 4-20, 5-20, 6-20, 7-20, 8-20, 9-20, 10-20, 11-20, 12-20, 13-20, 14-20 или 15-20. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения значение $c+d$ составляет более 80%, более 90% или более 95% от значения b. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения С представляет собой RGD-PEG_x-FcitFPro и D представляет собой PEG_y-ACit-PAVC, где x представляет собой 1-50, y представляет собой 4-30. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения х является большим, чем у.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полиамин поли(A_a -со- B_b) представляет собой случайный сополимер поли(акрилата), где А представляет собой акрилатный мономер, содержащий гидрофобную группу и В представляет собой акрилатный мономер, содержащий первичный амин. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения А представляет собой пропилакрилатный мономер и В представляет собой этокси-этиламинный акрилатный мономер.

Мембраноактивные полиамины являются мембраноактивными, и вследствие этого способны разрушать плазматические мембраны или лизосомальные/эндоцитозные мембраны. В настоящей заявке мембраноактивные полиамины представляют собой поверхностно-активные амфипатические полимеры, способные вызывать один или более из следующих эффектов в отношении биологической мембраны: изменение или разрушение мембраны, которое позволяет молекулам, не проникающим через мембраны, поступать в клетку или пересекать мембрану, образование пор в мембране, фрагментацию мембран или разрушение или растворение мембраны. В настоящей заявке мембрана или мембрана клетки содержит липидный бислой. Изменение или разрушение мембраны можно функционально определить на основании активности пептида в по меньшей мере одном из следующих анализов: лизиса красных кровяных клеток (гемолиза), утечки из липосомы, слияния липосом, слияния клеток, лизиса клеток и высвобождения из эндосомы. Пептиды или модифицированные пептиды, которые предпочтительно вызывают разрушение эндосом или лизосом по сравнению с плазматической мембраной, считают эндосомолитическими. Обратимо модифицированный мембраноактивный полиамин представляет собой пример эндосомоли-

тического пептида. Эффект мембраноактивных полимеров в отношении мембраны клетки может являться временным. Мембраноактивные полимеры обладают аффинностью в отношении мембраны и вызывают денатурацию или деформацию структур бислоя. Доставка РНК-триггера в клетку опосредована мембраноактивным полиамином, который разрушает или дестабилизирует плазматическую мембрану или мембрану внутренней везикулы (такой как эндосома или лизосома), в том числе вызывает образование пор в мембране или разрушение эндосомальных или лизосомальных пузырьков, что обеспечивает возможность высвобождения содержимого пузырька в цитоплазму клетки. Предпочтительный полимер представляет собой амфипатический поли(акрилатный) случайный сополимер.

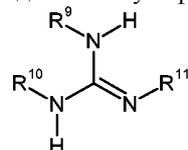
Интегринсвязывающее соединение.

Интегринсвязывающее соединение обладает аффинностью в отношении одного или более интегринов, экспрессированных на поверхности клетки. Неограничивающий пример интегрин включает интегрин $\alpha_v\beta_3$. Примеры интегринсвязывающих соединений включают, но не ограничены указанными, $\alpha_v\beta_3$ -связывающие соединения, лиганд RGD. Лиганды RGD включают соединения, содержащие пептид RGD, и соединения, содержащие миметик RGD. В настоящей заявке пептид RGD содержит трипептид аргинин-глицин-аспартат. Пептид RGD может являться конформационно напряженным. Пептид RGD может содержать непептидные компоненты, связанные с аминокислотной последовательностью RGD.

В настоящей заявке лиганд RGD содержит пептид RGD или миметик RGD размером <1500 кДа, который связывается с интегрином, таким как интегрин альфа в/бета 3 ($\alpha_v\beta_3$ или $\alpha_v\beta_3$) (или обладает аффинностью в отношении указанного интегрин).

В настоящей заявке миметик RGD представляет собой непептидную синтетическую молекулу, отличную от пептида RGD, которая биологическим способом имитирует активные детерминанты пептида RGD, интегринсвязывающую часть RGD интегринсвязывающего белка или интегринсвязывающий RGD-мотив $\alpha_v\beta_3$. Миметик RGD может содержать одну или две существующие в природе аминокислоты, связанные амидными связями. Миметик RGD может представлять собой модифицированный пептид, содержащий нестандартные аминокислоты или нестандартные боковые цепи аминокислот.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения лиганд RGD содержит группу гуанидиния, связанную с дипептидом глицин-аспартат амидной связью. Группы гуанидиния согласно настоящему изобретению имеют структуру, представленную формулой



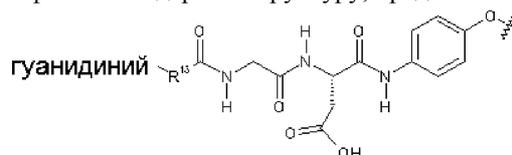
где R^9 и R^{10} независимо представляют собой водород или алкил и могут быть соединены для получения кольца, и

R^{11} представляет собой линкер, соединяющий группу гуанидиния с дипептидом глицин-аспартат.

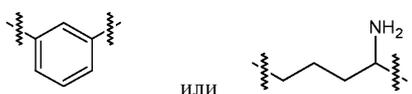
Группа гуанидиния включает как структуру, представленную выше, так и ее резонансные структуры. Предпочтительный линкер представляет собой $-(CRR')-(CRR')-(CRR')-$ или $-(CRR')-(CRR')-(CRR')-(CRR')-$, где

- каждый R является независимо необязательным и в случае наличия представляет собой независимо водород, алкил или арил,
- R представляет собой независимо водород, алкил, арил или NH_2 , и
- каждый углерод (C) может являться связанным одинарными связями, одинарной связью и двойной связью или ароматическими связями.

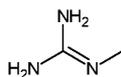
Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения миметик RGD содержит феноксигруппу, присоединенную к аминокислоте аспартат. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения миметик RGD содержит соединение гуанидиний-глицин-аспартат-4-аминофенокси. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения соединение гуанидиний-глицин-аспартат-4-аминофенокси содержит структуру, представленную формулой



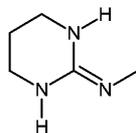
где R^{13} представляет собой



Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гуанидиний представляет собой

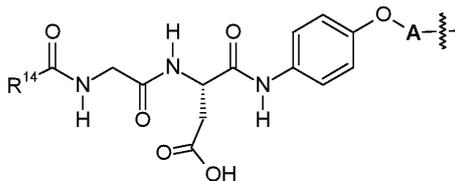


или

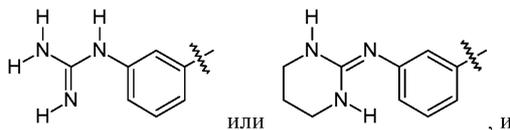


и резонансные структуры указанных соединений.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения миметик RGD содержит структуру, представленную формулой



где R¹⁴ представляет собой



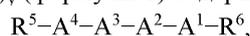
A содержит линкер. Линкер присоединяет миметик RGD к другой молекуле, такой как дипептид-аминобензил-карбонат или тетрапептид, которая обеспечивает увеличенную растворимость или обеспечивает способ ковалентного присоединения к другой молекуле.

Стерический стабилизатор.

В настоящей заявке стерический стабилизатор представляет собой неионный гидрофильный полимер (природный, синтетический или неприродный), который предотвращает или ингибирует внутримолекулярные или межмолекулярные взаимодействия полимера, к которому присоединен данный стерический стабилизатор, по сравнению с полимером, не содержащим стерический стабилизатор. Стерический стабилизатор препятствует вовлечению полимера, к которому присоединен данный стерический стабилизатор, в электростатические взаимодействия. Электростатическое взаимодействие представляет собой нековалентное связывание двух или нескольких веществ вследствие сил притяжения между положительным и отрицательным зарядами. Стерические стабилизаторы могут ингибировать взаимодействие с компонентами крови и вследствие этого опсонизацию, фагоцитоз и поглощение ретикулоэндотелиальной системой. Таким образом, стерические стабилизаторы могут увеличивать время циркуляции молекул, к которым присоединены данные стерические стабилизаторы. Стерические стабилизаторы также могут ингибировать агрегацию полимера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения стерический стабилизатор представляет собой полиэтиленгликоль (PEG) или производное PEG. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PEG может содержать приблизительно 1-500 мономеров или этиленовых единиц. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PEG содержит 2-25 этиленовых единиц. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PEG содержит 4-30 этиленовых единиц. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PEG содержит 5-24 этиленовые единицы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PEG характеризуется средней молекулярной массой приблизительно 85-20000 дальтон (Да). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PEG характеризуется молекулярной массой приблизительно 85-1000 Да. В настоящей заявке стерические стабилизаторы предотвращают или ингибируют межмолекулярные или внутримолекулярные взаимодействия полимера, к которому присоединены данные стерические стабилизаторы, по сравнению с полимером, не содержащим стерический стабилизатор, в водном растворе.

Обратимые физиологически лабильные связи/модифицирующие агенты Мембраноактивный полиамин может являться обратимо модифицированным. Обратимой модификации можно достичь путем обратимого присоединения к первичным аминам мембраноактивного полиамина модифицирующих агентов.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обратимая физиологически лабильная связь включает тетрапептидную связь. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения P-(L¹-M¹)_x и/или P-(L²-M²)_y (формулы 1) содержит



где R^5 содержит нацеливающую группу (M^1) или стерический стабилизатор (M^2),

A^4 представляет собой природную, неприродную изомерную или синтетическую гидрофобную L-аминокислоту, индекс гидрофобности (Monera et al., J. Protein Sci., 1995, 1, 319) которой при pH 7 составляет 41 или более, нормированный к глицину, поскольку таковой относится к составу боковой цепи аминокислоты (R-группы),

A^3 представляет собой незаряженную гидрофильную L-аминокислоту, индекс гидрофобности (Monera et al., J. Protein Sci., 1995, 1, 319) которой при pH 7 составляет -28 или менее, нормированный к глицину, поскольку таковой относится к составу боковой цепи аминокислоты (R-группы),

A^2 представляет собой природную, неприродную изомерную или синтетическую гидрофобную L-аминокислоту, индекс гидрофобности (Monera et al., J. Protein Sci., 1995, 1, 319) которой при pH 7 составляет 41 или более, нормированный к глицину, поскольку таковой относится к составу боковой цепи аминокислоты (R-группы),

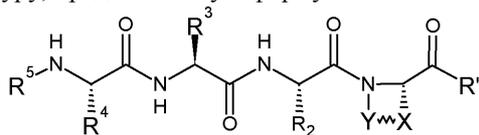
A^1 представляет собой L-пролин, L-лейцин или L-N-метилаланин, и

R^6 представляет собой P, где P представляет собой мембраноактивный полиамин формулы 1.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения A^1 представляет собой пролин, A^2 и A^4 независимо представляют собой аланин, валин, лейцин, изолейцин или фенилаланин (боковые цепи $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ или $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ соответственно) и A^3 представляет собой цитруллин или аспарагин (боковые цепи или $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ или $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ соответственно).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения A^1 представляет собой пролин, A^2 и A^4 представляют собой фенилаланин и A^3 представляет собой цитруллин (FCitFPro). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения A^1 представляет собой пролин, A^2 представляет собой фенилаланин и A^3 представляет собой цитруллин, и A^4 представляет собой аланин (ACitFPro).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения тетрапептидный модифицирующий агент содержит структуру, представленную формулой



где R^5 содержит нацеливающую группу (M^1) или стерический стабилизатор (M^2),

R^4 представляет собой боковую цепь природной, неприродной изомерной или синтетической гидрофобной аминокислоты,

R^3 представляет собой боковую цепь незаряженной гидрофильной аминокислоты, предпочтительно цитруллина,

R^2 представляет собой боковую цепь природной, неприродной изомерной или синтетической гидрофобной аминокислоты, предпочтительно фенилаланина,

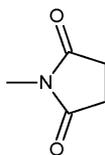
X и Y представляют собой

a) $(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_3)_2$ и H соответственно (тетрапептид A^1 представляет собой лейцин),

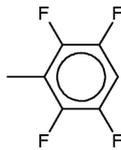
b) CH_3 - и CH_3 - соответственно (тетрапептид A^1 представляет собой N-метилаланин), или

c) CH_2 - и $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ - соответственно (тетрапептид A^1 представляет собой пролин), и

R представляет собой



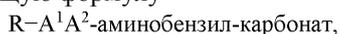
или



Реакция тетрапептидного модифицирующего агента с полиамином позволяет получить P-(L-M).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения R^4 представляет собой боковую цепь фенилаланина или аланина. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения R^3 представляет собой боковую цепь цитруллина. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения R^2 представляет собой боковую цепь фенилаланина.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мембраноактивный полиамин является модифицированным дипептидными модифицирующими агентами (модифицирующий агент дипептид-PAVC-PNP), имеющими общую формулу

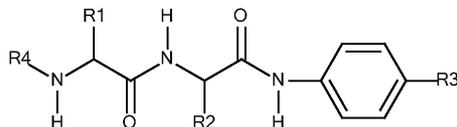


где R содержит стерический стабилизатор или нацеливающую группу,

A¹ представляет собой гидрофобную аминокислоту, и

A² представляет собой гидрофильную незаряженную аминокислоту.

Реакция карбоната модифицирующего агента с амином полимера позволяет получить карбаматную связь. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аминокбензильная группа представляет собой п-аминобензильную группу. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения карбонат представляет собой активированный аминокреактивный карбонат. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения отщепляемые линкеры дипептид-РАВС имеют общую структуру



где R4 содержит нацеливающую группу или стерический стабилизатор,

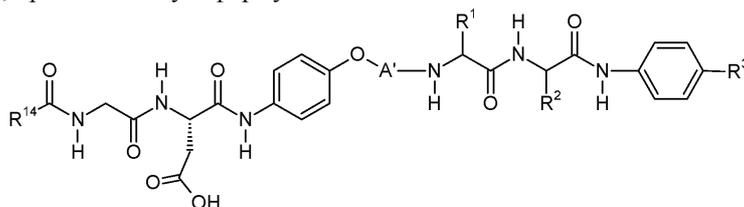
R3 содержит фрагмент аминокреактивного карбоната, такой как пара-нитрофенильная группа,

R1 представляет собой боковую цепь гидрофобной аминокислоты, такой как фенилаланин или аланин, и

R2 представляет собой боковую цепь гидрофильной незаряженной аминокислоты, такой как цитруллин (Cit).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения R1 представляет собой боковую цепь фенилаланина или аланина. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения R2 представляет собой боковую цепь цитруллина (Cit).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения модифицирующий агент RGD содержит структуру, представленную формулой



где R¹⁴ представляет собой гуанидиний-содержащую группу, как определено выше,

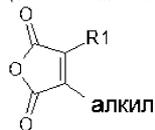
A' содержит PEG-содержащий линкер,

R¹ представляет собой боковую цепь фенилаланина или аланина,

R² представляет собой боковую цепь цитруллина, и

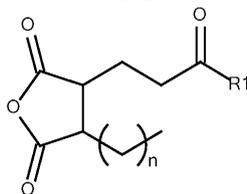
R³ представляет собой аминокреактивный карбонат.

Полимер для доставки может включать полиамин, обратимо модифицированный в результате реакции первичных аминов в полимере с двузамещенным алкилмалеиновым ангидридом



где R1 содержит нацеливающую группу или стерический стабилизатор.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения двузамещенный алкилмалеиновый ангидрид имеет структуру, представленную формулой

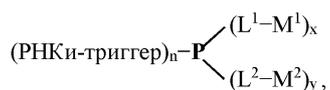


где R1 содержит нацеливающую группу или стерический стабилизатор.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нацеливающая группа (например, лиганд RGD) присоединена к модифицирующему агенту линкером, таким как линкер PEG. Линкер PEG может содержать 1-50 этиленовых единиц.

Модифицирующие агенты на основе RGD и PEG представлены на фиг. 1-7.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описаны композиции, представленные формулой



где РНКи-триггер представляет собой РНКи-триггер Hif2 α ,

n представляет собой 0,5-5,

P представляет собой мембраноактивный полиамин,

L¹-M¹ содержит RGD-PEG_a-FCitFPro-,

a представляет собой 1-50,

x представляет собой 1-20,

L²-M² содержит PEG_b-ACit-PABC-,

b представляет собой 4-30,

y является большим или равным 0, и

(M²-L²)_y-P-(L¹-M¹)_x не является мембраноактивным.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения значение x+y составляет более 80%, более 90% или более 95% от количества первичных аминов P. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения n представляет собой 0,5-2. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения p представляет собой 0,8-1,6. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения x представляет собой 2-20, 3-20, 4-20, 5-20, 6-20, 7-20, 8-20, 9-20, 10-20, 11-20, 12-20, 13-20, 14-20 или 15-20.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения значение a является большим, чем значение b.

Фармацевтические композиции.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере один из описанных РНКи-триггеров Hif2 α используют для получения фармацевтической композиции (т.е. лекарственного препарата) для лечения субъекта, который получит пользу от снижения или ингибирования экспрессии Hif2 α . Данные фармацевтические композиции являются пригодными для ингибирования экспрессии гена Hif2 α в клетке, ткани или организме. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описанные фармацевтические композиции применяют для лечения субъекта, страдающего от заболевания или нарушения, который получит пользу от снижения или ингибирования экспрессии Hif2 α .

В настоящей заявке фармацевтическая композиция или лекарственный препарат содержит фармакологически эффективное количество по меньшей мере одного из описанных РНКи-триггеров Hif2 α или конъюгатов, содержащих РНКи-триггеры Hif2 α и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества (вспомогательные вещества) представляют собой вещества, отличные от активной фармацевтической субстанции (АФС, терапевтического продукта, например РНКи-триггера), безопасность которых была соответствующим образом оценена и которые целенаправленно были включены в систему для доставки лекарственного препарата. Вспомогательные вещества не оказывают или не предназначены для оказания терапевтического эффекта в предусмотренной дозе. Вспомогательные вещества могут выступать для

- a) способствования обработке системы доставки лекарственного препарата в процессе изготовления,
- b) защиты, поддержания или усиления стабильности, биодоступности или переносимости АФС пациентом,
- c) способствования обнаружению продукта, и/или
- d) усиления другого свойства общей безопасности, эффективности, доставки АФС в процессе хранения или применения.

Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может представлять собой инертное вещество или может не представлять собой инертное вещество.

Вспомогательные вещества включают, но не ограничены указанными, вещества, способствующие всасыванию, антиадгезивные вещества, противовспенивающие вещества, антиоксиданты, связывающие вещества, связывающие вещества, буферные вещества, носители, покрывающие вещества, красители, вещества, способствующие доставке, декстран, декстрозу, разбавители, разрыхлители, эмульгирующие вещества, наполнители, вещества-наполнители, вкусоароматические вещества, вещества, способствующие скольжению, смачивающие вещества, смазывающие вещества, масла, полимеры, консерванты, солевой раствор, соли, растворители, сахара, суспендирующие средства, матрицы с замедленным высвобождением, подсластители, загустители, вещества, регулирующие тоничность, вещества основы, водоотталкивающие вещества и увлажняющие вещества.

Фармацевтическая композиция может содержать другие дополнительные компоненты, обычно присутствующие в фармацевтических композициях. Такие дополнительные компоненты включают, но не

ограничены указанными, противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства (например, антигистамин, дифенгидрамин и т.д.). Также предусмотрено, что клетки, ткани или выделенные органы, которые экспрессируют или содержат определенные в настоящей заявке РНК-триггеры, можно использовать в качестве "фармацевтических композиций". В настоящей заявке "фармакологически эффективное количество", "терапевтически эффективное количество" или просто "эффективное количество" означает такое количество РНК-триггера, которое обеспечивает предусмотренный фармакологический, терапевтический или профилактический результат.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описанный РНК-триггер Hif2 α объединяют с одним или более дополнительными терапевтическими средствами или средствами лечения, включая, но не ограничиваясь указанными, второй РНК-триггер Hif2 α или другой агент РНК, низкомолекулярный лекарственный препарат, антитело, фрагмент антитела и/или вакцина.

Описанные РНК-триггеры и фармацевтические композиции, содержащие РНК-триггеры Hif2 α , раскрытые в настоящей заявке, могут быть упакованы или включены в набор, контейнер, упаковку или дозатор. РНК-триггеры Hif2 α и фармацевтические композиции, содержащие указанные РНК-триггеры Hif2 α , могут быть упакованы в преднаполненные шприцы или флаконы.

Предусмотрены клетки, ткани и организмы, отличные от человека, которые содержат по меньшей мере один из РНК-триггеров Hif2 α , описанных в настоящей заявке. Клетка, ткань или организм, отличный от человека, получены путем доставки РНК-триггера в клетку, ткань или организм, отличный от человека, с помощью способов, доступных в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка представляет собой клетку млекопитающего, включая, но не ограничиваясь указанными, клетку человека. Клетка, ткань или организмы, отличные от человека, являются пригодными для исследования или в качестве инструментов исследования (например, исследования лекарственных препаратов или диагностики).

Способ лечения.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггеры Hif2 α , описанные в настоящей заявке, используют для лечения субъекта, страдающего от заболевания или нарушения, который получит пользу от снижения или ингибирования экспрессии Hif2 α . Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения описанные РНК-триггеры Hif2 α используют для лечения или предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего от заболевания или нарушения, который получит пользу от снижения или ингибирования экспрессии Hif2 α . Субъекту вводят терапевтически эффективное количество любого одного или более из описанных РНК-триггеров и посредством этого лечат симптом.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггеры Hif2 α используют для лечения или управления клинической картиной, причем субъекту, который нуждается в таком лечении, предотвращении или управлении, вводят терапевтически или профилактически эффективное количество одного или более РНК-триггеров Hif2 α или композиции, содержащей РНК-триггер Hif2 α , описанный в настоящей заявке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ включает введение композиции, содержащей молекулу РНК-триггера Hif2 α , описанную в настоящей заявке, млекопитающему, лечение которого проводят.

Иллюстративные заболевания, которые получают пользу от снижения и/или ингибирования экспрессии генов Hif2 α , включают, но не ограничены указанными, рак, рак почки, светлоклеточную почечно-клеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, астроцитому (рак головного мозга), рак мочевого пузыря, рак молочной железы, хондросаркому, колоректальную карциному, карциному желудка, глиобластому, плоскоклеточную карциному головы и шеи, гепатоклеточную карциному, аденокарциному легкого, нейробластому, меланому, множественную миелому, рак яичников, рак прямой кишки, метастазы, гингивит, псориаз, герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши, презлампию, воспаление, хроническое воспаление, неоваскулярные заболевания и ревматоидный артрит.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α можно использовать для ингибирования экспрессии Hif2 α в клетке, группе клеток или ткани, например, у субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения РНК-триггер Hif2 α можно использовать для приготовления в состав композиции для ингибирования экспрессии Hif2 α в клетке, группе клеток или ткани, например, у субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту вводят терапевтически эффективное количество РНК-триггеров Hif2 α , описанных в настоящей заявке, одного типа (или нескольких различных типов), посредством этого ингибируя экспрессию Hif2 α у субъекта (например, количество, эффективное для ингибирования экспрессии Hif2 α у субъекта).

В настоящей заявке термины "сайленсировать", "снижать", "ингибировать", "понижающе регулировать" или "провести нокдаун экспрессии генов" в отношении гена Hif2 α означают, что экспрессия гена, которую определяют на основании уровня РНК, транскрибируемой с гена, или на основании уровня полипептида, белка или субъединицы белка, транслируемых с мРНК, в клетке, группе клеток или ткани, в

которых транскрибируется ген Hif2 α , снижается, когда клетку, группу клеток или ткань лечат описанными триггерами РНКи Hif2 α , по сравнению со второй клеткой, группой клеток или тканью, которые были или не были обработаны таким способом, или по сравнению с той же клеткой, группой клеток или тканью до введения РНКи-триггера Hif2 α .

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения уровень экспрессии генов и/или уровень мРНК Hif2 α у субъекта, которому вводят описанный РНКи-триггер Hif2 α , понижается по меньшей мере приблизительно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 98% относительно субъекта до введения РНКи-триггера Hif2 α или субъекта, не принимавшего РНКи-триггер Hif2 α . Уровень экспрессии генов и/или уровень мРНК у субъекта может быть понижен в клетке, группе клеток и/или ткани субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения уровень белка Hif2 α у субъекта, которому был введен описанный РНКи-триггер Hif2 α , понижается по меньшей мере приблизительно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 98% относительно субъекта до введения РНКи-триггера Hif2 α или субъекта, не принимавшего РНКи-триггер Hif2 α . Уровень белка у субъекта может быть понижен в клетке, группе клеток, ткани, крови и/или других жидкостях субъекта. Снижение экспрессии генов, уровней мРНК или белка можно оценить любыми способами, известными в данной области техники. Снижение или уменьшение уровня мРНК Hif2 α и/или уровня белка в настоящей заявке в совокупности обозначены как снижение или уменьшение Hif2 α либо ингибирование или снижение экспрессии Hif2 α .

"Введение в клетку" в отношении РНКи-триггера означает функциональную доставку РНКи-триггера в клетку. Под функциональной доставкой подразумевают, что РНКи-триггер доставляют в клетку, и данный РНКи-триггер обладает ожидаемой биологической активностью (например, последовательность-специфичным ингибированием экспрессии генов).

Путь введения представляет собой путь, посредством которого осуществляется контакт РНКи-триггера с организмом. Как правило, способы введения лекарственных препаратов и нуклеиновых кислот для лечения субъекта хорошо известны в данной области техники и их можно применять для введения композиций, описанных в настоящей заявке. Соединения, описанные в настоящей заявке, можно вводить посредством любого подходящего пути в препарате, соответствующим образом приспособленном к данному пути. Таким образом, соединения, описанные в настоящей заявке, можно вводить путем инъекции, например, внутривенным, внутримышечным, внутрикожным, подкожным или интраперитонеальным путем.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекулы или композиции РНКи-триггера Hif2 α , описанные в настоящей заявке, могут быть доставлены в клетку, группу клеток, ткань или субъект с применением технологий доставки олигонуклеотидов, известных в данной области техники. Как правило, любой подходящий способ, признанный в данной области техники для доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*), можно приспособить для применения с РНКи-триггером Hif2 α , описанным в настоящей заявке. Например, доставку можно осуществлять путем местного введения (например, прямой инъекции, имплантации или местного применения), системного введения или подкожного, внутривенного, перорального, интраперитонеального или парентерального путей, включая внутривенное (например, внутривенное, пероральное, интраперитонеальное или парентеральное) путей, включая внутривенное (например, внутривенное, пероральное, интраперитонеальное и интратекальное), внутримышечное, трансдермальное введение, введение через дыхательные пути (аэрозоль), назальное, ректальное или местное (включая буккальное и сублингвальное) введение. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения композиции вводят путем подкожной или внутривенной инфузии или инъекции.

Предложенные выше варианты реализации и объекты настоящего изобретения теперь проиллюстрированы следующими неограничивающими примерами.

Примеры

Пример 1. Синтез РНКи-триггера.

А. Синтез.

Молекулы РНКи-триггера синтезировали согласно фосфорамидитной технологии на твердой фазе, используемой для синтеза олигонуклеотидов. В зависимости от масштаба использовали MerMade96E (Bioautomation) или MerMade12 (Bioautomation). Синтез проводили на твердой подложке, изготовленной из стекла с заданным размером пор (CPG, 500 Å или 600 Å, получали в компании Prime Synthesis, Астон, Пенсильвания, США). Все ДНК-, 2'-модифицированные РНК- и UNA- (unlocked nucleic acid, незапертая нуклеиновая кислота) фосфорамидиты заказывали в компании Fisher Scientific (Милуоки, Висконсин, США). В частности, использовали следующие 2'-О-метил-фосфорамидиты: (5'-О-диметокситритил-N⁶- (бензоил)-2'-О-метил-аденозин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропил-амино) фосфорамидит, 5'-О-диметокситритил-N⁴-(ацетил)-2'-О-метил-цитидин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропил-амино) фосфорамидит, (5'-О-диметокситритил-N²-(изобутирил)-2'-О-метил-гуанозин-3'-О-(2-циано-этил-N,N-диизопропиламино) фосфорамидит и 5'-О-диметокситритил-2'-О-метил-уридин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино) фосфорамидит. 2'-Дезокси-2'-фтор-фосфорамидиты несли те же защитные группы, что и 2'-О-метиламидиты РНК.

Использовали следующие UNA-фосфорамидиты: 5'-(4,4'-диметокситритил)-N-бензоил-2',3'-секо-аденозин, 2'-бензоил-3'-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]фосфор-амидит, 5'-(4,4'-диметокситритил)-N-ацетил-2',3'-секо-цитозин, 2'-бензоил-3'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]фосфорамидит, 5'-(4,4'-диметокситритил)-N-изобутирил-2',3'-секо-гуанозин, 2'-бензоил-3'-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]фосфорамидит и 5'-(4,4'-диметокси-тритил)-2',3'-секо-уридин, 2'-бензоил-3'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]фосфорамидит. Все амидиты растворяли в безводном ацетонитриле (50 мМ) и добавляли молекулярные сита (3 Å). С целью введения ТЕГ-холестерола на 5'-конце олигомеров применяли 1-диметокситритилокси-3-О-(N-холестерил-3-аминопропил)-триэтиленгликоль-глицерил-2-О-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)-фосфорамидит от компании Glen Research (Стерлинг, Вирджиния, США). 5'-модификации вводили без какой-либо модификации цикла синтеза. 5-Бензилтио-1Н-тетразол (ВТТ, 250 мМ в ацетонитриле) использовали в качестве активирующего раствора. Времена сочетания составляли 10 мин (РНК), 180 с (холестерол), 90 с (2'Оме и UNA) и 60 с (2'Г и ДНК). С целью введения фосфотиоатных связей применяли 100 мМ раствор 3-фенил 1,2,4-дигидро-5-она (POS, получали в компании PolyOrg, Inc., Леоминстер, Массачусетс, США) в безводном ацетонитриле. См. конкретные последовательности в табл. 1, 2 и 5.

В. Отщепление и снятие защиты с олигомера, присоединенного к подложке.

После окончания твердофазного синтеза высушенную твердую подложку обрабатывали раствором в объемном соотношении 1:1 40 мас.% метиламина в воде и 28% раствора гидроксида аммония (Aldrich) в течение 2 ч при температуре 30°C. Раствор выпаривали, и сухой остаток восстанавливали в воде (см. ниже).

С. Очистка.

Неочищенные олигомеры, содержащие холестерол, очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с применением колонки Waters XBridge BEH300 C4 5u Prep и системы Shimadzu LC-8. Буфер А представлял собой 100 мМ ТЕАА, pH 7,5 и содержал 5% ацетонитрила, и буфер В представлял собой 100 мМ ТЕАА и содержал 95% ацетонитрила. Фиксировали показатели УФ-поглощения при 260 нм. Затем соответствующие фракции анализировали методом эксклюзионной ВЭЖХ с применением колонки GE Healthcare XK 16/40, упакованной средой Sephadex G-25, с подвижным буфером, содержащим 100 мМ бикарбонат аммония, pH 6,7 и 20% ацетонитрила. Другие неочищенные олигомеры очищали методом анионообменной ВЭЖХ с применением колонки TKSgel SuperQ-5PW 13u и системы Shimadzu LC-8. Буфер А представлял собой 20 мМ Tris, 5 мМ EDTA, pH 9,0 и содержал 20% ацетонитрила, и буфер В являлся таким же, как и буфер А, с добавлением 1,5 М хлорида натрия. Фиксировали показатели УФ-поглощения при 260 нм. Соответствующие фракции объединяли, затем анализировали методом эксклюзионной ВЭЖХ, как описано для олигомеров, содержащих холестерол.

Д. Отжиг.

Комплементарные цепи смешивали путем объединения эквимольных растворов (смысловой и антисмысловой цепей) в 0,2× ФБР (фосфатно-буферный солевой раствор, 1×, Corning, Cellgro) для получения РНКи-триггеров. Данный раствор помещали в термомиксер при температуре 70°C, нагревали до температуры 95°C, выдерживали при температуре 95°C в течение 5 мин и медленно охлаждали до комнатной температуры. Некоторые РНКи-триггеры лиофилизировали и хранили при температуре от -15 до -25°C. Концентрацию дуплекса определяли путем измерения поглощения раствора на спектрометре в ультрафиолетовой и видимой области спектра в 0,2× ФБР. Затем для определения концентрации дуплекса поглощение раствора при 260 нм умножали на коэффициент конверсии и фактор разведения. Если не указано обратное, все коэффициенты конверсии составляли 0,037 мг/(мл·см). В некоторых экспериментах коэффициент конверсии рассчитывали на основании определенного экспериментальным путем коэффициента экстинкции.

Пример 2. Синтез амфипатических мембраноактивных полиаминов APN 1170-100A (100A), APN 1203-006 (006), APN 1203-064 (064).

Полимер	ММ (защищенный)	Теоретическая ММ (после снятия защиты)	PDI	% Введенных аминов	% Введенных алкилов	% Удаления концевых групп	Азиды/полимер
APN 1170-100A	64430	45765	1,22	56	44	0	1,25
APN 1203-006	60330	43578	1,05	56	44	99	1,14
APN 1203-062	65170	46736	1,05	54	46	99	0,96

А. Материалы.

2,2'-Азобис(2,4-диметилвалеронитрил) (V-65, инициатор радикальной полимеризации) заказывали в компании Wako Pure Chemical Industries. Пропилакрилат заказывали в компании Polysciences Inc. N-Вос-этоксипропионакрилат получали в компании WuXi Inc. 2-(додецилтио-карбонотиоилтио)-2-метилпропионовую кислоту (DDMAT, RAFT-агент), 1,1'-азобис-(цикло-гексанкарбонитрил) (ACHN), 1-этилпиперидингипофосфит (EPHP), пентафторфенол, N,N'-дициклогексилкарбодиимид и N,N-диизопропил-этиламин заказывали в компании Sigma Aldrich. О-(2-Аминоэтил)-О'-(2-азидоэтил)триэтиленгликоль (азидо-PEG₄-амин) заказывали в компании Biomatrik Inc.

В. RAFT-сополимер N-Вос-этоксиптиламинакрилата и пропилакрилата (ЕАР).

Готовили растворы V-65 (2 мг/мл) и RAFT-агента DDMAT (10 мг/мл) в бутилацетате. Исходный молярный состав мономера являлся следующим: 52% N-Вос-этоксиптиламинакрилата, 48% пропилакрилата. Теоретическая ММ составляла 75000. Молярное отношение RAFT-агента (DDMAT) к инициатору (V-65) составляло 6,67:1. N-Вос-этоксиптиламинакрилат (1,778 г, 6,86 ммоль), пропилакрилат (0,794 мл, 0,722 г, 6,33 ммоль), раствор DDMAT (1,215 мл, 0,0333 ммоль), раствор V-65 (0,621 мл, 0,005 ммоль) и бутилацетат (10,2 мл) вносили в стеклянную пробирку объемом 20 мл с магнитной мешалкой. Пробирку запечатывали крышкой с диафрагмой и через раствор барботировали азот с применением длинной иглы со второй иглой в качестве выходного канала в течение 1 ч. Иглы удаляли и пробирку нагревали до температуры 50°C в течение 24 ч при перемешивании. Раствору позволяли охладиться до комнатной температуры и переносили поровну в две центрифужные пробирки объемом 50 мл до добавления гексана (35 мл) в обе пробирки. Раствор центрифугировали в течение 2 мин при 4400 об/мин. Слой супернатанта аккуратно сцеживали, и нижний слой промывали гексаном. Затем нижний слой из каждой пробирки повторно растворяли в дихлорметане (7 мл), преципитировали в гексане (40 мл) и еще раз центрифугировали. Супернатант сцеживали и нижний слой промывали гексаном перед тем как слои объединяли в одну центрифужную пробирку объемом 50 мл и полимер высушивали под пониженным давлением в течение нескольких часов. Выход неочищенного ЕАР-сополимера составлял 2,1 г. Образцы сополимера отбирали для анализа методом многоугольного рассеяния излучения (MALS) и ¹H-ЯМР.

Полимер 006. Состав, определенный методом ¹H-ЯМР, являлся следующим: 55% N-Вос-этоксиптиламинакрилата и 45% пропилакрилата. ММ 006, определенная методом MALS, составила 58600 г/моль с индексом полидисперсности (PDI) 1,04.

Полимер 100А. Состав, определенный методом ¹H-ЯМР: 56% N-Вос-этоксиптиламинакрилата и 44% пропилакрилата. ММ, определенная методом MALS: 65150, PDI 1,122.

Полимер 064. Состав, определенный методом ¹H-ЯМР: 54% N-Вос-этоксиптиламинакрилата и 46% пропилакрилата. ММ 064, определенная методом MALS, составила 57957 г/моль, индекс полидисперсности (PDI) 1,07.

С. Индуцированное радикалами удаление ω-концевой группы (полимеры 006 и 064).

Готовили растворы 1,1'-азобис-(циклогексанкарбонитрила) (ACHN, 20 мг/мл) и 1-этилпиперидингипофосфита (ЕРНР, 100 мг/мл) в толуоле. ЕАР (2 г, 0,035 ммоль), АСНН (0,213 мл, 0,5 экв., 0,0174 ммоль), ЕРНР (1,25 мл, 20 экв., 0,697 ммоль) и толуол (25,2 мл) вносили в стеклянную пробирку объемом 40 мл с магнитной мешалкой. Пробирку запечатывали крышкой с диафрагмой и через раствор барботировали азот с применением длинной иглы со второй иглой в качестве выходного канала в течение 1 ч. Иглы удаляли и пробирку нагревали до температуры 100°C в течение 2 ч. Раствору позволяли охладиться до комнатной температуры и ~20 мл толуола удаляли путем ротационного выпаривания. Оставшийся раствор переносили в центрифужную пробирку объемом 50 мл и добавляли гексан (35 мл). Раствор центрифугировали в течение 2 мин при 4400 об/мин. Слой супернатанта аккуратно сцеживали и нижний слой промывали гексаном. Затем нижний слой повторно растворяли в дихлорметане (7 мл), преципитировали в гексане (40 мл) и еще раз центрифугировали. Супернатант сцеживали и нижний слой промывали гексаном перед тем как полимер высушивали под пониженным давлением в течение ~1 ч. Полимер растворяли в метил-трет-бутиловом эфире (80 мл) и переносили в делительную воронку. Затем раствор промывали 3 объемами Н₂О по 30 мл с последующей промывкой 3 объемами насыщенного NaCl по 30 мл. Затем раствор полимера высушивали над сульфатом натрия и фильтровали через вакуум-фильтры GHP 0,45 мкм. МТВЕ удаляли путем ротационного выпаривания в высоком вакууме. Отбирали образец для контроля удаления концевой группы с применением УФ-спектрофотометра. Удаление концевой группы согласно расчету составило 99%. Отбирали образцы для анализа методом MALS, ГХ-ПИД (газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором) и ¹H-ЯМР. Состав 006, определенный методом ¹H-ЯМР, являлся следующим: 55% N-Вос-этоксиптиламинакрилата и 45% пропилакрилата. Конверсия 006, определенная методом ГХ-ПИД, составила 81,4% для N-Вос-этоксиптиламинакрилата и 77,3% для пропилакрилата. Конверсия 100А, определенная методом ГХ-ПИД, составила 87% для N-Вос-этоксиптиламинакрилата и 83% для пропилакрилата. ММ полимера 006, определенная методом MALS, составила 57700 г/моль с индексом полидисперсности (PDI) 1,06.

Д. Активация α-концевой группы пентафторфенолом.

ЕАР-полимер (2 г, 0,0347 ммоль), пентафторфенол (63,8 мг, 0,3466 ммоль), N,N'-дихлоргексилкарбодимид (71,5 мг, 0,3466 ммоль) и дихлорметан (40 мл) вносили в круглодонную колбу объемом 100 мл с магнитной мешалкой. Колбу закупоривали резиновой мембраной и через систему продували азот в течение 15 мин. Раствор перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. Добавляли дополнительный пентафторфенол (63,8 мг, 0,3466 ммоль) и N,N'-дихлоргексилкарбодимид (71,5 мг, 0,3466 ммоль), колбу закупоривали резиновой мембраной и через систему продували азот в течение 15 мин. Раствор перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Полимер преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали и растворитель сцеживали. Полимер растворяли в минимальном количестве дихлорметана, преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали и рас-

творитель сжегивали. Полимер растворяли в минимальном количестве этилацетата, преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали и растворитель сжегивали. Преципитат полимера высушивали в высоком вакууме до тех пор, пока твердое вещество не достигало постоянной массы.

Е. Функционализация α -концевой группы азидом.

В круглодонной колбе объемом 100 мл, оборудованной резиновой мембраной и магнитной мешалкой, полимер с предшествующей стадии (1,9 г, 0,0329 ммоль) растворяли в дихлорметане (38 мл). В колбу при перемешивании добавляли азидо-PEG₄-амин (86,4 мг, 0,3293 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин (46,8 мг, 63,1 мкл, 0,3622 ммоль). Через систему продували азот в течение 15 мин и реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение ночи. В колбу добавляли дополнительный азидо-PEG₄-амин (86,4 мг, 0,3293 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин (46,8 мг, 63,1 мкл, 0,3622 ммоль), через систему продували газообразный N₂ и реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Полимер преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали и растворитель сжегивали. Полимер растворяли в минимальном количестве дихлорметана, преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали и растворитель сжегивали. Преципитат полимера высушивали в высоком вакууме до тех пор, пока твердое вещество не достигло постоянной массы. Выход функционализированного азидом EAP составил 1,77 г. Образцы сополимера отбирали для анализа методом многоуглового рассеяния излучения (MALS) и ¹H-ЯМР.

Полимер 006. Состав, определенный методом ¹H-ЯМР, являлся следующим: 56% N-Вос-этоксидиэтиламинакрилата и 44% пропилакрилата. ММ, определенная методом MALS, составила 60330 г/моль с индексом полидисперсности (PDI) 1,05.

Полимер 100А. Состав, определенный методом ¹H-ЯМР, являлся следующим: 56% N-Вос-этоксидиэтиламинакрилата и 44% пропилакрилата. ММ, определенная методом MALS: 64430 с PDI 1,217.

Полимер 064. Состав, определенный методом ¹H-ЯМР, являлся следующим: 54% N-Вос-этоксидиэтиламинакрилата и 46% пропилакрилата. ММ, определенная методом MALS: 65170 с PDI 1,05.

Моноазид.

Термин "моноазид" или "моноазидный полимер" указывает, что были проведены стадии D и E вышеописанных процедур, и азидную группу сочетали с α -концевой группой полимера.

Ф. Снятие защиты Вос и фильтрация тангенциальным потоком.

В круглодонную колбу объемом 100 мл к функционализированному азидом EAP-сополимеру (1,67 г, 0,0277 ммоль) добавляли 2 М HCl в уксусной кислоте (28 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Добавляли деионизированную H₂O (56 мл) и перемешивали в течение 10 мин. Затем раствор немедленно заменяли 10 эквивалентными объемами 5 мМ фосфатно-цитратного буфера (pH 5) с применением модуля фильтров mPES 30 кДа 115 см², оборудованного системой фильтрации тангенциальным потоком (KrosFlo Research). Затем раствор концентрировали с применением аппарата до конечного объема 55 мл. Было зафиксировано значение pH 5,1. Образцы отбирали для определения концентрации методом парофазной газовой хроматографии. Аликвоту лиофилизировали, а затем восстанавливали в 33,3% ацетонитриле-d в оксиде дейтерия до концентрации 10 мг/мл для анализа методом ¹H-ЯМР. Рассчитанная теоретическая ММ составила 43026 и 45765 г/моль для 006 и 100А соответственно.

Г. С применением аналогичных методик можно с легкостью получить аналогичные амфипатические мембраноактивные полиамины.

В частности, амфипатические мембраноактивные полиамины с молекулярной массой (ММ) 40-120 к (защищенные), от 25 до 85 к (после снятия защиты), с PDI от 1,03 до 1,2 и отношением мономеров от 35% мономера с амином/65% мономера с гидрофобной группой до 70% мономера с амином/30% мономера с гидрофобной группой.

Пример 3. Синтез APN 1095-126 (126).

ММ (защищенный)	Теоретическая ММ (после снятия защиты)	PDI	% Встраивания амина	% Встраивания алкила	% Удаления концевой группы	Азидов на полимер
66670	47606	1,11	56	44	0	4,1

При синтезе APN 1095-126 использовали дитиобензоатный фрагмент RAFT-агента и RAFT-инициатор AIBN вместо тритиокарбонатного фрагмента RAFT-агента и RAFT-инициатора V-65, которые применяли для синтеза 100А и 006. Условия для данной полимеризации требовали отличных температур и времен нагрева. Помимо этого, для данного полимера требовалось фракционное осаждение. Полимер не являлся эндкепированным, но способ добавления азидов являлся таким же, что и в случае 100А и 006.

А. Материалы.

Пропилакрилат заказывали в компании Polysciences Inc. N-Вос-этоксидиэтиламинакрилат получали в компании WuXi Inc. 4-циано-4-(фенилкарбонотиоилтио) пентановую кислоту (CPCPA, RAFT-агент), 2,2'-азобис(2-метилпропионитрил) (AIBN, инициатор радикальной полимеризации), пентафторфенол, N,N'-дидиклогексилкарбодимид и N,N-диизопропилэтиламин заказывали в компании Sigma Aldrich. O-(2-Аминоэтил)-O'-(2-азидоэтил)триэтиленгликоль (азидо-PEG₄-амин) заказывали в компании Bioma-

trik Inc.

В. RAFT-сополимер N-Вос-этоксиптиламинакрилата и пропилакрилата (ЕАР).

Следующую процедуру повторяли 8 раз с получением в совокупности 4,5513 г фракционированного ЕАР-сополимера. Готовили растворы AIBN (1,035 мг/мл) и RAFT-агента СРСРА (50,54 мг/мл) в бутилацетате. Молярный состав исходной мономерной смеси являлся следующим: 52% N-Вос-этоксиптиламинакрилата, 48% пропилакрилата. Теоретическая ММ составляла 75000. Молярное отношение RAFT-агента (СРСРА) к инициатору (AIBN) составляло 6,67:1.

N-Вос-этоксиптиламинакрилат (1,7879 г, 6,9 ммоль), пропилакрилат (0,774 мл, 0,7121 г, 6,24 ммоль), раствор СРСРА (0,184 мл, 0,0333 ммоль), раствор AIBN (0,793 мл, 0,005 ммоль) и бутилацетат (11,02 мл) вносили в стеклянную пробирку объемом 20 мл с магнитной мешалкой. Пробирку запечатывали крышкой с диафрагмой и через раствор барботировали азот с применением длинной иглы со второй иглой в качестве выходного канала в течение 1 ч. Иглы удаляли и пробирку нагревали до температуры 50°C в течение 24 ч при перемешивании. Раствору позволяли охладиться до комнатной температуры и перенесли в центрифужную пробирку объемом 50 мл перед добавлением гексана (35 мл). Раствор центрифугировали в течение 2 мин при 4400 об/мин. Слой супернатанта аккуратно сцеживали и нижний слой промывали гексаном. Затем нижний слой из каждой пробирки повторно растворяли в дихлорметане (7 мл), преципитировали в гексане (40 мл) и еще раз центрифугировали. Супернатант сцеживали и нижний слой промывали гексаном, перед тем как полимер высушивали под пониженным давлением в течение нескольких часов. Выход неочищенного ЕАР-сополимера составил 1,734 г. Образцы неочищенного сополимера отбирали для анализа методом многоуглового рассеяния излучения (MALS) и ¹H-ЯМР. Высушенный неочищенный сополимер растворяли в DCM (100 мг/мл). Добавляли гексан до момента достижения точки помутнения. Полученный в результате непрозрачный раствор центрифугировали. Нижний слой экстрагировали и полностью преципитировали в гексане. Фракцию центрифугировали, после чего сополимер выделяли и высушивали в вакууме. Выход выделенной фракции ЕАР-сополимера составил 0,602 г. Образцы фракционированного сополимера отбирали для анализа методом ¹H-ЯМР и MALS. Состав, определенный методом ¹H-ЯМР, являлся следующим: 56% N-Вос-этоксиптиламинакрилата и 44% пропилакрилата. ММ, определенная методом MALS, составила 62010 г/моль с индексом полидисперсности (PDI) 1,14.

С. Активация α-концевой группы пентафторфенолом.

ЕАР-полимер (2 г, 0,0347 ммоль), пентафторфенол (63,8 мг, 0,3466 ммоль), N,N'-дициклогексилкарбодимид (71,5 мг, 0,3466 ммоль) и дихлорметан (40 мл) вносили в круглодонную колбу объемом 100 мл с магнитной мешалкой. Колбу закупоривали резиновой мембраной и через систему продували азот в течение 15 мин. Раствор перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. Добавляли дополнительный пентафторфенол (63,8 мг, 0,3466 ммоль) и N,N'-дициклогексилкарбодимид (71,5 мг, 0,3466 ммоль), колбу закупоривали резиновой мембраной и через систему продували азот в течение 15 мин. Раствор перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Полимер преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали и растворитель сцеживали. Полимер растворяли в минимальном количестве дихлорметана, преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали и растворитель сцеживали. Полимер растворяли в минимальном количестве этилацетата, преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали и растворитель сцеживали. Преципитат полимера высушивали в высоком вакууме до тех пор, пока твердое вещество не достигало постоянной массы.

Д. Функционализация α-концевой группы азидом.

В круглодонной колбе объемом 100 мл, оборудованной резиновой мембраной и магнитной мешалкой, полимер с предшествующей стадии (1,9 г, 0,0329 ммоль) растворяли в дихлорметане (38 мл). В колбу при перемешивании добавляли азидо-PEG₄-амин (86,4 мг, 0,3293 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин (46,8 мг, 63,1 мкл, 0,3622 ммоль). Через систему продували азот в течение 15 мин и реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение ночи. В колбу добавляли дополнительный азидо-PEG₄-амин (86,4 мг, 0,3293 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин (46,8 мг, 63,1 мкл, 0,3622 ммоль), через систему продували газообразный N₂ и реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Полимер преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали и растворитель сцеживали. Полимер растворяли в минимальном количестве дихлорметана, преципитировали гексаном (~10× объем), центрифугировали и растворитель сцеживали. Преципитат полимера высушивали в высоком вакууме до тех пор, пока твердое вещество не достигало постоянной массы. Выход функционализированного азидом ЕАР составил 1,77 г. Образцы сополимера отбирали для анализа методом многоуглового рассеяния излучения (MALS) и ¹H-ЯМР. Состав, определенный методом ¹H-ЯМР, являлся следующим: 56% N-Вос-этоксиптиламинакрилата и 44% пропилакрилата. ММ, определенная методом MALS, составила 66670 г/моль с индексом полидисперсности (PDI) 1,11.

Е. Снятие защиты Вос и фильтрация тангенциальным потоком.

В круглодонную колбу объемом 100 мл к функционализированному азидом ЕАР-сополимеру (1,67 г, 0,0277 ммоль) добавляли 2 М HCl в уксусной кислоте (28 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Добавляли деионизированную H₂O (56 мл) и перемешивали в

течение 10 мин. Затем раствор немедленно заменяли 10 эквивалентными объемами 5 мМ фосфатно-цитратного буфера (рН 5) с применением модуля фильтров mPES 30 кДа 115 см², оборудованного системой фильтрации тангенциальным потоком (KrosFlo Research). Затем раствор концентрировали с применением аппарата до конечного объема 55 мл. Было зафиксировано значение рН 5,1. Образцы отбирали для определения концентрации методом парофазной газовой хроматографии. Аликвоту лиофилизировали, а затем восстанавливали в 33,3% ацетонитриле-d в оксиде дейтерия до концентрации 10 мг/мл для анализа методом ¹H-ЯМР. Рассчитанная теоретическая ММ составила 43026 г/моль.

Пример 4. Аналитические данные о полимере.

(i) Анализ методом MALS.

Приблизительно 10 мг сополимера растворяли в 0,5 мл 75% дихлорметана, 20% тетрагидрофурана и 5% ацетонитрила. Молекулярную массу и полидисперсность (PDI) измеряли с применением детектора мультиракурсного светорассеяния Wyatt Heleos II, присоединенного к аппарату для ВЭЖХ Shimadzu Prominence с применением колонки Jordi, 5 мкм, 7,8×300, Mixed Bed LS DVB. Молекулярная масса (полимер 006) до снятия защиты: 60330 (PDI 1,05).

(ii) Конверсия мономера методом газовой хроматографии.

Приблизительно 40 мкл раствора сополимера (раздел В) отбирали после перемешивания (до барботирования N₂), после барботирования N₂ и после завершения реакции. Образцы разводили в 100 раз в этилацетате. Образцы анализировали на приборе Shimadzu GC-2010 plus, оснащенном пламенно-ионизационным детектором, с применением колонки Phenomenex Zebron capillary (ZB-5, 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина фазы 0,5 мкм). Конверсию мономера измеряли с применением образца до барботирования N₂ в качестве калибровки по одной точке путем сравнения концентраций мономера после реакции с концентрациями мономера до реакции/после барботирования N₂.

(iii) Концентрация полимера на основании содержания пропанола с применением парофазной газовой хроматографии (ПФ-ГХ).

Раствор полимера после снятия защиты (~20 мг/мл) разводили в 50 раз в 3 М NaOH с применением 1-бутанола в качестве внутреннего стандарта. Реакционную пробирку запечатывали и встряхивали в течение 1 ч. Затем реакционную смесь инкубировали в течение по меньшей мере 6 ч при комнатной температуре. Во флаконе для парофазного анализа объемом 10 мл к насыщенному NaCl (500 мкл) и HCl (4 М, 250 мкл) добавляли гидролизованное исследуемое соединение (250 мкл) и систему запечатывали. Исследуемые соединения анализировали с помощью аппарата Shimadzu GC-2010 plus с парофазным пробоотборником HS-20 с применением колонки Phenomenex ZB-WAX plus gc (30,0 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина фазы 0,25 мкм). Затем количественно определяли концентрацию пропанола с применением кривой внешнего стандарта или пропанола, содержащего ту же матрицу NaCl/HCl/NaOH. После этого концентрацию полимера рассчитывали путем деления концентрации пропанола на количество пропанола на полимер, которое было определено в результате встраивания мономера.

(iv) Количественное определение азиды с применением УФ-спектроскопии.

Раствор полимера после снятия защиты (~20 мг/мл) разводили до концентрации ~5 мг/мл в 60 мМ MES, рН 6. Затем проводили реакцию полимера с DBCO-амином (2,5 молярных эквивалентов) при комнатной температуре в течение по меньшей мере 6 ч. Рассчитывали разницу поглощения при 310 нм и определяли содержание азиды на полимер.

Пример 5. Фильтрация тангенциальным потоком и анализ конъюгата.

После образования конъюгата, т.е. модификации полимера путем добавления модифицирующих агентов на основе RGD и PEG и присоединения РНКи-триггера (см. пример 9 ниже), раствор конъюгата (2 мг/мл, 10 мл) заменяли 10 эквивалентными объемами 5 мМ фосфатно-цитратного буфера (рН 5) с применением модуля фильтров mPES 30 кДа 115 см², оборудованного системой фильтрации тангенциальным потоком (KrosFlo Research). Было зафиксировано значение рН 5,1.

А. Характеризация и анализ конъюгата.

(i) Концентрация полимера в процессе конъюгации. Для контроля концентрации полимера в процессе сборки конъюгата использовали тот же способ, что и в разделе G(iii).

(ii) Количественное определение примесей методом обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Конъюгат полимера (после очистки TFF) разводили до концентрации 1 мг/мл H₂O и инжесктировали в аппарат для ВЭЖХ Shimadzu Prominence с УФ-детектором SPD-20А и колонкой Waters Xbridge C18, 5 мкм, 4,6×250 мм. В способе использовали двойной градиент, который состоял из H₂O/ацетонитрила/0,1% муравьиной кислоты с обнаружением при 247 нм. Концентрации PEG_n-ACit-PAВОН, RGD-PEG_n-FCFP-СООН и PNP рассчитывали с применением количественного определения на основе внешнего стандарта.

(iii) Модификация RGD-PEG_n-FCitFP-TFP и PEG_n-ACit-PAВC-PNP посредством аминокислотного анализа.

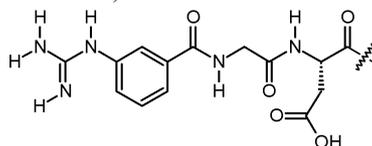
Конъюгат полимера (после очистки TFF) с норвалином в качестве внутреннего стандарта гидролизуют в течение 16 ч в HCl (6 М) при температуре 110°C в запечатанной пробирке для гидролиза. Затем гидролизационный раствор нейтрализовали NaOH, разводили боратным буфером (рН 10,1) и деривативировали с применением фтальдиальдегида/3-меркаптопропиононовой кислоты.

Затем образец инжестрировали в систему Shimadzu Nexera ВЭЖХ с автоматическим пробоотборником SIL-30А, детектором на основе фотодиодной матрицы SPD -20А и колонкой Waters Xbridge C18, 5 мкм, 4,6×250 мм. Образец элюировали с применением двойного градиента 10 мМ тетрабората декагидрата натрия/10 мМ двухосновного фосфата натрия/5 мМ азида натрия и 45% метанола/45% ацетонитрила/10% H₂O. УФ-обнаружение проводили при 338 нм. Концентрации аланина и фенилаланина рассчитывали с применением кривых внешних стандартов. Концентрации аланина и фенилаланина вместе с концентрацией полимера и встраиванием мономера использовали для расчета суммарной модификации аминокрупп, а также соотношения между обоими лигандами.

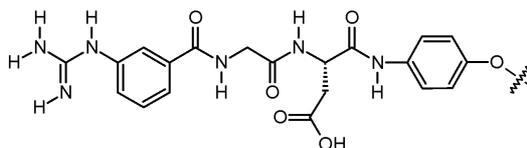
(iv) Количественное определение триггера РНК и чистоты конъюгата методом эксклюзионной хроматографии.

Собирали аппарат Shimadzu Prominence ВЭЖХ, оснащенный УФ-детектором SPD-20А и колонкой для эксклюзионной хроматографии Acclaim SEC-300, 4,6×300 мм, 5 мкм, 300 Å (1-я в блоке), присоединенной к колонке для эксклюзионной хроматографии Acclaim SEC-1000, 4,6×300 мм, 7 мкм, 1000 Å (2-я в блоке). Использовали изократический способ с применением 200 мМ NaBr, 10 мМ Tris рН 8, 1 мМ EDTA и 20% ацетонитрила в качестве подвижной фазы с обнаружением при 260 нм. Образец конъюгата полимера (после добавления триггера РНК) разводили в подвижной фазе и инжестрировали в систему. Другой образец конъюгата разводили согласно той же схеме, но обрабатывали 200 мМ дитиотреитолом в течение 2 ч перед инжестрией в систему. Концентрацию триггера РНК для обоих образцов рассчитывали с применением кривой внешнего стандарта. Количество конъюгированного триггера РНК рассчитывали путем вычитания уровней РНК, обработанной DTT, из уровней необработанной РНК. Чистоту конъюгата после TFF также определяли с применением данного способа.

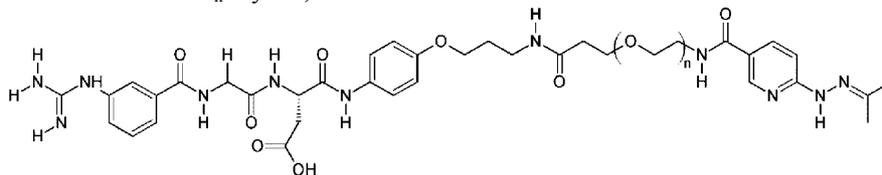
Пример 6. Лиганды RGD (миметик RGD).



или

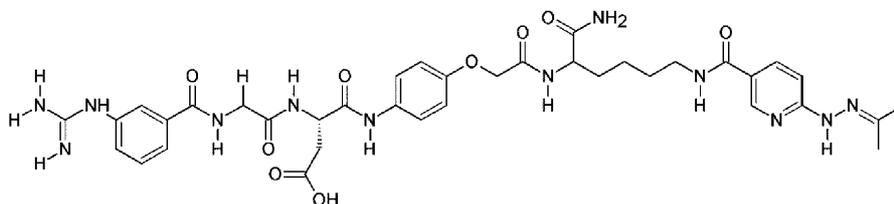


A. Миметик RGD № 1-PEG_n-HyNic, ММ 1272.

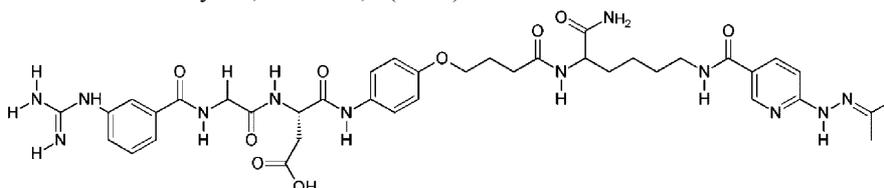


n = 4 – 24 (предпочтительно, 8 – 12)

B. Миметик RGD № 1a-HyNic, ММ 802,8.



C. Миметик RGD № 1b-HyNic, ММ 830,9 (RGD).



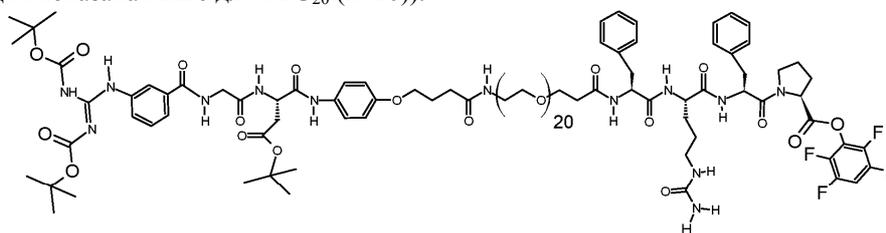
Пример 7. Модифицирующие агенты на основе RGD и PEG.

A. Дипептидные модифицирующие агенты RGD-дипептид и PEG-дипептид получали, как описано в публикациях US 20120172412 A1 (WO 2012/092373) и US 20150045573 A1 (WO 2015/021092) (обе из которых включены в настоящую заявку посредством ссылки); фиг. 3-7.

В. Синтез модифицирующего агента RGD-PEG_n-FCitFP-TFP и PEG_n-FCitFP-TFP.

Предшественник модифицирующего агента (di-Boc)RGD(OtBu)-APBA-PEG_n-FCitFPPro-COOH получали с применением твердофазного синтеза на основе общей химии Fmoc с использованием смолы 2-Cl-Trt, предварительно нагруженной Fmoc-пролин-OH. К смоле-Pro-Fmoc последовательно добавляли (после снятия защиты Fmoc на каждой стадии): Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Cit-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-NH-PEG_n-COOH, 4-(N-Fmoc-п-аминофенокси)-масляную кислоту (APBA), Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH и diboc-N-гуанидино-бензойную кислоту.

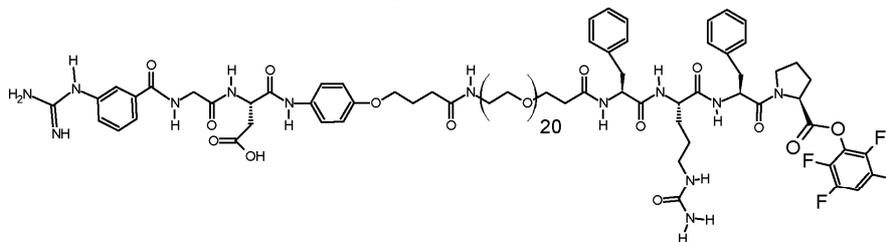
(diboc)RGD(OtBu)-APBA-PEG_n-FCitFPPro-COOH (458 мг, 0,200 ммоль) и TFP (66,5 мг, 0,400 ммоль) растворяли в безводном DCM (5,0 мл) и охлаждали до температуры 0°C на ледяной бане при перемешивании в атмосфере аргона. Добавляли EDC (77 мг, 0,400 ммоль) и реакционную смесь перемешивали на ледяной бане при температуре 0°C в течение 30 мин, прохождение реакции контролировали методом ТСХ (тонкослойной хроматографии, 8,5:1,5 CHCl₃:MeOH); реакция была завершена через 90 мин, причем какое-либо исходное вещество не обнаруживалось методом ТСХ. Реакционную смесь разводили DCM до общего объема 100 мл, промывали 3×40 мл деионизированной H₂O (pH 5) и промывали 1×40 мл водного насыщенного раствора NaCl. Затем органический слой высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали путем ротационного выпаривания с получением 448 мг (выход 92 %) коричнево-оранжевой пены. Структуру подтверждали методом ¹H-ЯМР и МС-ИЭР (масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением, реакция показана выше для PEG₂₀ (n=20)).



(diboc)RGD(OtBu)-APBA-PEG_n-FCitFPPro-TFP

(показано для n = 20)

(diboc)RGD(OtBu)-PEG_n-FCitFPPro-TFP (497 мг, 0,204 ммоль) растворяли в смеси [9,25:0,75:0,50] TPA:H₂O:тиоанизол (5,0 мл) и перемешивали при комнатной температуре в закрытой колбе в течение 45 мин. Завершение реакции подтверждали методом МС, масс-спектрометрии (ИЭР, ионизация электрораспылением, отрицательное сканирование, 300-3000); наблюдаемые массы, относящиеся к исходному веществу или промежуточным продуктам с частично снятой защитой, отсутствовали. Затем реакционную смесь преципитировали в 45 мл диэтилового эфира, центрифугировали, супернатант сливали, промывали 2×10 мл диэтилового эфира и высушивали в высоком вакууме в течение ночи. Конечный продукт очищали методом препаративной ВЭЖХ с применением полупрепаративной колонки Thermo Aquasil C18, 5 мкм с подвижными фазами 0,1% TFA в H₂O и ACN. Каждая инъекция представляла собой 50 мг неочищенного вещества, растворенного в 3,0 мл 0,1% TFA в [61:39] H₂O:ACN, которую анализировали при градиенте (указан в %B) 39-(5)-39-(35)-43-(5)-95-(10)-95-(2)-39-(5)-39. Каждый образец для инъекции готовили (растворяли) в течение 15 минут перед инъектированием и положительные фракции объединяли в одной колбе и хранили охлажденными в морозильной камере до тех пор, пока не была выполнена последняя инъекция в день. Затем положительные фракции концентрировали на ротационном испарителе при температуре бани 32°C досуха, затем прогоняли 2× ACN/толуол, затем 3× ACN, после чего высушивали в высоком вакууме в течение ночи. Из инъектированных 257 мг неочищенного вещества в виде чистого вещества выделяли 180 мг (70%) (реакция показана выше для PEG₂₀ (n=20)).



RGD-PEG_n-FCitFPPro-TFP

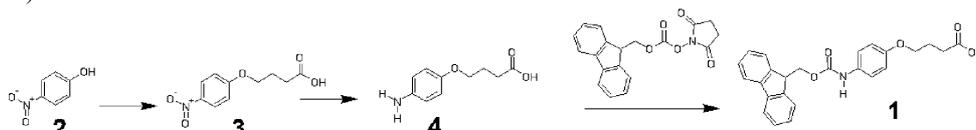
(показано для n = 20)

Синтез 4-(N-Fmoc-п-аминофенокси)-масляной кислоты 1. п-нитрофенол (2) (7,5 г, 53,9 ммоль) объединяли с этил-4-бромбутиратом (8,45 мл, 59 ммоль) и K₂CO₃ (7,5 г, 54 ммоль) в DMF (75 мл). Смесь

перемешивали в течение 2 ч при температуре 100°C. DMF удаляли и неочищенный продукт разводили в смеси в соотношении 3:12 н. NaOH и метанола и перемешивали в течение 4 ч при к.т. Реакционную смесь подкисляли 6 М HCl. Белый преципитат собирали с получением 4-(п-нитрофенилокси)-масляной кислоты 3: (10,9 г, выход 90%).

4-(п-нитрофенилокси)-масляную кислоту 3 (37,1 г, 165 ммоль) растворяли в MeOH (1 л) с формиатом аммония (35 г, 555 ммоль) и добавляли 10% Pd/C (типа Дегусса) (3,5 г). Смесь нагревали в обратном холодильнике при температуре 65°C в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали через целит с получением красновато-коричневого твердого вещества продукта 4-(п-аминофенилокси)-масляной кислоты 4 (30,5 г, выход 95%).

4-(п-аминофенилокси)-масляную кислоту 4 (5,1 г, 26 ммоль) растворяли в смеси в соотношении 6:4 водного насыщенного NaHCO₃ (3,36 г, 40 ммоль) в H₂O (450 мл) и THF (300 мл) с получением белой густой суспензии. Добавляли Fmoc-OSu (8,82 г, 26,1 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч. Ацетон удаляли, реакцию подкисляли (HCl) и белый с металлическим оттенком преципитат собирали и растирали в 1 н. HCl с получением 9,6 г продукта 4-(N-Fmoc-п-аминофенилокси)-масляной кислоты 1 (выход 88%).



diBoc-м-гуанидино-бензойную кислоту 5 синтезировали согласно публикации Riches AG et al., *Tetrahedron* (2012), 68, p. 9448-9455.

Модифицирующие агенты PEG_n-FCitFP получали с применением аналогичных химических реакций; фиг. 1, 2.

Пример 8. Тетрапептидные пептидные связи.

А. Синтез тетрапептидов.

Все тетрапептиды синтезировали аналогичным образом с применением стандартных твердофазных процедур Fmoc. Некоторые пептиды синтезировали из коммерчески доступной смолы 2-Cl-Trt (EMD Millipore, Биллерика, Массачусетс), содержащей пролин, лейцин или аланин. В случае других пептидов смолу 2-Cl-Trt загружали Fmoc-PEG_n-CO₂H или Fmoc-N-метил-Ala-CO₂H путем добавления к смоле 2-Cl-Trt раствора DMF, содержащего аминокислоты или PEG (1 экв.) и DIEA (2 экв.), в течение 16 ч. После завершения смолы экипировали MeOH. Пошаговое добавление проводили с применением PVBOP (4 экв.), аминокислоты (4 экв.) и DIEA (8 экв.) для сочетания и 20% пиперидина в DMF для снятия защиты Fmoc.

После синтеза пептида проводили реакцию тетрапептидов с 2 экв. сложных эфиров, активированных N-гидроксисукцинимидом (NHS), защищенных N-ацетил-галактозамином, NAG(OAc)₃ (Rozema DB et al., "Protease-triggered siRNA Delivery Vehicles", *J. Control. Release.*, 2015, vol. 209:57-66; и патент США 8802773), или PEG_n в DMF, содержащем 4 экв. DIEA. После присоединения NAG(OAc)₃ или PEG пептиды удаляли от смолы с применением HFIP (30%) в DCM в течение 0,5 ч. После удаления растворителя осадок растирали с Et₂O.

Тетрапептиды очищали и конъюгировали с активированными сложными эфирами для получения модифицирующих агентов или конъюгировали с хромофором N-(п-нитрофенил)этилендиамином (pNA) без очистки для получения субстратов для исследования физиологической лабильности. Перед очисткой MAO(OAc)₃-содержащие субстраты деацетилировали путем обработки TEA (35%) в воде (45%) и MeOH (20%) и перемешивали при комнатной температуре. Для очистки тетрапептидные субстраты разделяли методом ВЭЖХ с применением колонки с обращенной фазой Thermo Scientific Aquasil C18 (250×21,2, Уолтем, Массачусетс) при элюировании градиентом ацетонитрила и воды, забуференной 0,1% муравьиной кислотой. После очистки субстраты лиофилизировали.

Присоединение аминокислотных групп к тетрапептиду. 1 экв. пептида, очищенного методом ВЭЖХ, с N-концевым NAG (R₅=NAG(OH)₃) или PEG (R₅=PEG_n) в DMF или DCM добавляли в высушенную над пламенем колбу при температуре 0°C с получением концентрации пептида 0,2 М. Добавляли NHS (3 экв.) и N,N'-дициклогексилкарбодиимид (DCC) (3 экв.) и оставляли перемешиваться при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение ночи с получением модифицирующих агентов. Смесь частично концентрировали, охлаждали до температуры -20°C и фильтровали. Затем все растворители удаляли в вакууме. Осадок растворяли в минимальном количестве DCM и MeOH, преципитировали в холодном Et₂O и собирали путем декантирования растворителя после центрифугирования. Преципитацию в Et₂O повторяли до тех пор, пока остаточная DCU (дициклогексилмочевина) переставала обнаруживаться. Все полученные соединения впоследствии использовали без дополнительной очистки.

Пример 9. Модификация полимера. Образование конъюгата для доставки миРНК с применением RGD-PEG-НyNіc, RGD-PEG-ACit-PNP или RDG-PEG-FCitFP-TFP и модифицирующих агентов PEG-дипептид.

1) Протокол 1.

Проводили реакцию указанного полимера с SMPT при массовом соотношении 1:0,015 (полимер:SMPT) в 5 мМ буфере HEPES, pH 8,0, в течение 1 ч при к.т. Затем проводили реакцию SMPT-модифицированного полимера с модифицирующим агентом альдегид-PEG-дипептид (альдегид-PEG₁₂-FCit или альдегид-PEG₂₄-ACit) при предусмотренных соотношениях в течение 1 ч при к.т. Затем проводили реакцию модифицированного полимера с модифицирующим агентом PEG₁₂-дипептид (PEG₁₂-FCit, PEG₁₂-ACit или PEG₂₄-ACit) при массовом соотношении 1:2 (полимер:PEG) в 100 мМ буфере HEPES, pH 9,0 в течение 1 ч при к.т. Затем в течение ночи проводили реакцию модифицированного полимера с SATA-РНКи-триггером при массовом соотношении 1:0,2 (полимер:SATA-РНКи-триггер) в 100 мМ буфере HEPES, pH 9,0 при к.т. для присоединения РНКи-триггера. Затем проводили реакцию модифицированного полимера с отщепляемым протеазой PEG (PEG₁₂-FCit или PEG₁₂-ACit или PEG₂₄-ACit) при массовом соотношении 1:6 (полимер:PEG) в 100 мМ буфере HEPES, pH 9,0, в течение 1 ч при к.т. Полученный в результате конъюгат очищали с применением колонки sephadex G-50 spin.

RGD-НyNіc (пример 6B) присоединяли к модифицированному полимеру для получения полного конъюгата для доставки путем осуществления реакции с модифицированным полимером при массовом соотношении 1:0,7 (полимер: миметик RGD-НyNіc) в 50 мМ буфере MES, pH 5,0, в течение минимум 4 ч при к.т. Конъюгат очищали с применением колонки sephadex G-50 spin. Эффективность присоединения лиганда RGD определяли, как описано выше.

2) Протокол 2.

Проводили реакцию указанного полимера с SMPT при массовом соотношении 1:0,015 (полимер:SMPT) в 5 мМ буфере HEPES, pH 8,0, в течение 1 ч при к.т. Затем проводили реакцию SMPT-модифицированного полимера с модифицирующим агентом альдегид-PEG-дипептид (альдегид-PEG₂₄-ACit) при массовом соотношении 1:0,5 (полимер:PEG) и с модифицирующим агентом PEG-дипептид (PEG₁₂-FCit, PEG₁₂-ACit или PEG₂₄-ACit) при массовом соотношении 1:2 (полимер:PEG) в 100 мМ буфере HEPES, pH 9,0, в течение 1 ч при к.т. Затем проводили реакцию модифицированного полимера в течение ночи с SATA-РНКи-триггером при массовом соотношении 1:0,2 (полимер:SATA-РНКи-триггер) в 100 мМ буфере HEPES, pH 9,0 при к.т. для присоединения РНКи-триггера. После этого проводили реакцию модифицированного полимера с отщепляемым протеазой PEG (PEG₁₂-FCit или PEG₁₂-ACit или PEG₂₄-ACit) при массовом соотношении 1:6 (полимер:PEG) в 100 мМ буфере HEPES, pH 9,0, в течение 1 ч при к.т. RGD-НyNіc (пример 6) присоединяли к модифицированному полимеру для получения полного конъюгата путем осуществления реакции с модифицированным полимером при массовом соотношении 1:0,7 (полимер:RGD-НyNіc) в 69 мМ растворе хлорида водорода (HCl) в течение ночи при к.т. Эффективность присоединения лиганда RGD определяли, как описано выше.

3) Протокол 3.

Проводили реакцию указанного полимера с SMPT при массовом соотношении 1:0,015 (полимер:SMPT) в 5 мМ буфере HEPES, pH 8,0 в течение 1 ч при к.т. Затем проводили реакцию SMPT-модифицированного полимера с модифицирующим агентом альдегид-PEG-дипептид (альдегид-PEG₂₄-ACit) при массовом соотношении 1:0,5 (полимер:PEG) и с модифицирующим агентом PEG-дипептид (PEG₁₂-FCit, PEG₁₂-ACit или PEG₂₄-ACit) при массовом соотношении 1:2 (полимер:PEG) в 50 мМ буфере HEPES, pH 9,0, в течение 1 ч при к.т. Затем проводили реакцию модифицированного полимера в течение ночи с SATA-РНКи-триггером при массовом соотношении 1:0,2 (полимер:SATA-РНКи-триггер) в 50 мМ буфере HEPES, pH 9,0 при к.т. для присоединения РНКи-триггера. После этого проводили реакцию модифицированного полимера с отщепляемым протеазой PEG (PEG₁₂-FCit или PEG₁₂-ACit или PEG₂₄-ACit) при массовом соотношении 1:6 (полимер:PEG) в 50 мМ буфере HEPES, pH 9,0, в течение 1 ч при к.т. RGD-НyNіc (пример 6) присоединяли к модифицированному полимеру для получения полного конъюгата для доставки путем осуществления реакции с модифицированным полимером при массовом соотношении 1:0,7 (полимер: миметик RGD-НyNіc) в 100 мМ растворе свободной кислоты MES в течение ночи при к.т. Эффективность конъюгации нацеленного на RGD лиганда определяли, как описано выше.

4) Протокол 4.

Проводили реакцию указанного полимера с азидо-PEG4-NHS при массовом соотношении 1:0,015 (полимер:азид) в 5 мМ буфере HEPES, pH 8,0, в течение 1 ч при к.т. Затем проводили реакцию азидо-модифицированного полимера с модифицирующим агентом альдегид-PEG-дипептид (альдегид-PEG₂₄-ACit) при массовом соотношении 1:0,5 (полимер:PEG) и с модифицирующим агентом PEG-дипептид (PEG₁₂-ACit) при массовом соотношении 1:2 (полимер:PEG) в 50 мМ буфере HEPES, pH 9,0, в течение 1 ч при к.т. Затем в течение ночи проводили реакцию модифицированного полимера с алкин-РНКи-триггером при массовом соотношении 1:0,2 (полимер:алкин-РНКи-триггер) в 50 мМ буфере HEPES, pH 9,0 при к.т. для присоединения РНКи-триггера. После этого проводили реакцию модифицированного полимера с отщепляемым протеазой PEG (PEG₁₂-ACit) при массовом соотношении 1:6 (полимер:PEG) в 50 мМ буфере HEPES, pH 9,0, в течение 1 ч при к.т. RGD-НyNіc (пример 6) присоединяли к модифици-

рованному полимеру для получения полного конъюгата для доставки путем осуществления реакции с модифицированным полимером при массовом соотношении 1:0,7 (полимер: миметик RGD-HyNic) в 100 mM буферном растворе ацетата натрия-уксусной кислоты, pH 5,0, в течение ночи при к.т. Эффективность конъюгации нацеленного на RGD лиганда определяли, как описано выше.

5) Протокол 5.

Проводили реакцию моноазидного полимера с модифицирующим агентом альдегид-PEG-дипептид (альдегид-PEG₂₄-ACit) при массовом соотношении 1:0,5 (полимер:PEG) и с модифицирующим агентом PEG-дипептид (PEG₁₂-ACit) при массовом соотношении 1:2 (полимер:PEG) в 50 mM буфере HEPES, pH 9,0, в течение 1 ч при к.т. Затем в течение ночи проводили реакцию модифицированного полимера с алкин-РНКи-триггером при массовом соотношении 1:0,2 (полимер:алкин-РНКи-триггер) в 50 mM буфере HEPES, pH 9,0 при к.т. для присоединения РНКи-триггера. После этого проводили реакцию модифицированного полимера с отщепляемым протеазой PEG (PEG₁₂-ACit) при массовом соотношении 1:6 (полимер:PEG) в 50 mM буфере HEPES, pH 9,0, в течение 1 ч при к.т. RGD-HyNic (пример 6) присоединяли к модифицированному полимеру для получения полного конъюгата для доставки путем осуществления реакции с модифицированным полимером при массовом соотношении 1:0,7 (полимер:миметик RGD-HyNic) в 100 mM буферном растворе ацетата натрия-уксусной кислоты, pH 5,0, в течение ночи при к.т. Эффективность конъюгации нацеленного на RGD лиганда определяли, как описано выше.

6) Протокол 6.

Проводили реакцию моноазидного полимера с отщепляемым протеазой RGD-агентом (RGD-PEG₈-ACit-PNP, RGD-PEG₈-FCitFP-TFP, RGD-PEG₁₅-FCitFP-TFP, RGD-PEG₁₉-FCitFP-TFP или RGD-PEG₂₀-FCitFP-TFP) при массовых соотношениях 1:0,125, 1:0,25, 1:0,5, 1:1, 1:1,5, 1:2 (полимерно) в 50 mM буфере HEPES, pH 8,5, в течение 4 ч при к.т. Затем проводили реакцию модифицированного полимера с отщепляемым протеазой PEG-агентом (PEG₆-ACit-PABC-PNP, PEG₁₂-ACit-PABC-PNP, PEG₁₂-FCit-PABC-PNP, PEG₁₂-FCitFP-TFP) при массовом соотношении 1:8 (полимер:PEG) в 50 mM буфере HEPES, pH 8,5, в течение 2 ч при к.т. Алкин-РНКи-триггер добавляли к модифицированному полимеру при массовом соотношении 1:0,3 (полимер:алкин-РНКи-триггер) в буферном растворе 100 mM ацетата натрия-уксусной кислоты, pH 5,0, в течение 5 дней при к.т. Завершенный конъюгат очищали методом TFF и определяли эффективность конъюгации.

7) Протокол 7.

Проводили реакцию моноазидного полимера с отщепляемым протеазой RGD-агентом (RGD-PEG₂₀-FCitFP-TFP) при массовом соотношении 1:1 (полимер:RGD) в 50 mM буфере HEPES, pH 8,5, в течение 2 ч при к.т. Затем проводили реакцию модифицированного полимера с отщепляемым протеазой PEG-агентом (PEG₁₂-ACit-PABC-PNP) при массовом соотношении 1:8 (полимер:PEG) в 50 mM буфере HEPES, pH 8,5, в течение 2 ч при к.т. Затем модифицированный полимер очищали методом TFF. К полимеру, очищенному методом TFF, добавляли алкин-РНКи-триггер при массовом соотношении 1:0,4 (полимер:алкин-РНКи-триггер) в течение 3 дней при температуре 37°C.

Пример 10. Анализ РНКи-триггеров Hif2 α in vitro.

Последовательности-кандидаты обнаруживали путем анализа in silico и проводили скрининг в качестве химически модифицированных канонических миРНК in vitro. Для целей скрининга последовательность к ДНК EPAS1 человека (Hif2 α) (учетный № NM_001430) синтезировали и клонировали (DNA 2.0, Менло-Парк, Калифорния) в коммерчески доступные плазмиды для скрининга на основе репортера, psiCHECK2 (Promega, Мэдисон, Висконсин), который образовывал слитую мРНК люциферазы Renilla/EPAS1. Для оценки эффективности РНКи-триггера клетки Hep3B, линию гепатоклеточной карциномы человека, высевали в концентрации ~10000 клеток на лунку в 96-луночном формате. Проводили совместную трансфекцию каждым из 187 РНКи-триггеров EPAS1 в двух подгруппах в двух концентрациях, 1 и 0,1 нМ, 25 нг ДНК плазмиды EPAS1-psiCHECK2 на лунку и 0,2 мкл LipoFectamine 2000 (Life Technologies) на лунку. Нокдаун гена определяли путем измерения уровней люциферазы Renilla, нормированных к уровням конститутивно экспрессируемой люциферазы светлячка, также присутствующей в плазмиде psiCHECK-2, с применением набора для анализа репортерного гена двойной люциферазы (Dual Luciferase Reporter Assay, Promega, Мэдисон, Висконсин); табл. 5.

Последовательности немодифицированной антисмысловой цепи и смысловой цепи РНК-триггера Hif2 α

SEQ ID NO.	Последовательность смысловой цепи (5' → 3')	SEQ ID NO.	Последовательность антисмысловой цепи (5' → 3')
285	GAGACUGUAUGGUCAGCUC	478	GAGCUGACCAUACAGUCUC
286	CUCCGACUCCUCCGACUC	479	GAGUCGGAAGGAGUCGGAG
287	UCCGACUCCCAGCAUUCGA	480	UCGAAUGCUGGGAGUCGGA
288	CGACUCCCAGCAUUCGAGC	481	GCUCGAAUGCUGGGAGUCG
289	GACUCCCAGCAUUCGAGCC	482	GGCUCGAAUGCUGGGAGUC
290	CAGGUGCUCGGCGUCUGAA	483	UUCAGACGCCGAGCACCUG
291	GUGCUCGGCGUCUGAACGU	484	ACGUUCAGACGCCGAGCAC
292	UCGGCGUCUGAACGUCUCA	485	UGAGACGUUCAGACGCCGA
293	GGCGUCUGAACGUCUAAA	486	UUUGAGACGUUCAGAGCC
294	CGUCUGAACGUCUCAAAGG	487	CCUUUGAGACGUUCAGACG
295	AAAAGGAGUAGCUCGGAGA	488	UCUCCGAGCUACUCCUUUU
296	GGUUUCAUUGCCGUGGUG	489	CACCACGGCAAUGAAACCC
297	UUCAUGGGACUUACACAGG	490	CCUGUGUAAGUCCCAUGAA
298	GGGACUUACACAGGUGGAG	491	CUCCACCUGUGUAAGUCCC
299	ACACAGGUGGAGCUAACAG	492	CUGUUAGCUCCACCUGUGU
300	GAGCUAACAGGACAUAGUA	493	UACUAUGUCCUGUUAGCUC
301	GCUAACAGGACAUAGUAUC	494	GAUACUAUGUCCUGUUAGC
302	CUAACAGGACAUAGUAUCU	495	AGAUACUAUGUCCUGUUAG
303	GGACAUAGUAUCUUUGACU	496	AGUCAAAAGAUACUAUGUCC
304	UCUUUGACUUCACUCAUCC	497	GGAUGAGUGAAGUCAAGA
305	UCACUCAUCCUGCGACCA	498	UGGUCGCAGGGAUGAGUGA
306	GAGAUUCGUGAGAACCUGA	499	UCAGGUUCUCACGAAUCUC
307	UUCGUGAGAACCUGAGUCU	500	AGACUCAGGUUCUCACGAA
308	UCGUGAGAACCUGAGUCUC	501	GAGACUCAGGUUCUCACGA
309	GACAUGUCCACAGAGCGGG	502	CCCGCUCUGUGGACAUGUC
310	GCGGGACUUCUUAUGAGG	503	CCUCAUGAAGAAGUCCCGC
311	GGAUGAAGUGCACGGUCAC	504	GUGACCGUGCACUUCAUCC
312	CACGGUCACCAACAGAGGC	505	GCCUCUGUUGGUGACCGUG
313	UCACCAACAGAGGCCGUAC	506	GUACGGCCUCUGUUGGUGA
314	CACCAACAGAGGCCGUACU	507	AGUACGGCCUCUGUUGGUG
315	AGGCCGUACUGUCAACCUC	508	GAGGUUGACAGUACGGCCU
316	UCCUCACAAUAGUCUGUGU	509	ACACAGACUAUUGUGAGGA
317	AAUAGUCUGUGUGGCUACA	510	UGUAGCCACACAGACUAAU
318	CAGAACUGAUUGGUUACCA	511	UGGUAACCAAUCAGUUCUG
319	AGAACUGAUUGGUUACCAC	512	GUGGUAACCAAUCAGUUCU
320	CUGAUUGGUUACCACCCUG	513	CAGGGUGGUAACCAAUCAG

321	UUGGCCGCUCAGCCUAUGA	514	UCAUAGGCUGAGCGGCCAA
322	UAUGAAUUCUACCAUGCGC	515	GCGCAUGGUAGAAUUCAUA
323	AUGAAUUCUACCAUGCGCU	516	AGCGCAUGGUAGAAUUCAU
324	UGAAUUCUACCAUGCGCUA	517	UAGCGCAUGGUAGAAUUCA
325	GAAUUCUACCAUGCGCUAG	518	CUAGCGCAUGGUAGAAUUC
326	AAUUCUACCAUGCGCUAGA	519	UCUAGCGCAUGGUAGAAUU
327	UCUACCAUGCGCUAGACUC	520	GAGUCUAGCGCAUGGUAGA
328	AUGCGCUAGACUCCGAGAA	521	UUCUCGGAGUCUAGCGCAU
329	UGCGCUAGACUCCGAGAAC	522	GUUCUCGGAGUCUAGCGCA
330	GUAAGUGGCCAGUACCGGA	523	UCCGGUACUGGCCACUUA
331	UAAGUGGCCAGUACCGGAU	524	AUCCGGUACUGGCCACUUA
332	CCAGUACCGGAUGCUCGCA	525	UGCGAGCAUCCGGUACUGG
333	AGUACCGGAUGCUCGCAAA	526	UUUGCGAGCAUCCGGUACU
334	UACCGGAUGCUCGCAAAAGC	527	GCUUUGCGAGCAUCCGGUA
335	UGCUCGCAAAAGCAUGGGGG	528	CCCCAUGCUUUUGCGAGCA
336	CGCAAAGCAUGGGGGCUAC	529	GUAGCCCCCAUGCUUUUGCG
337	AGCAUGGGGGCUACGUGUG	530	CACACGUAGCCCCCAUGCU
338	GCAUGGGGGCUACGUGUGG	531	CCACACGUAGCCCCCAUGC
339	CAUCUACAACCCUCGCAAC	532	GUUGCGAGGGUUGUAGAUG
340	AUCUACAACCCUCGCAACC	533	GGUUGCGAGGGUUGUAGAU
341	CUACAACCCUCGCAACCU	534	CAGGUUGCGAGGGUUGUAG
342	UACAACCCUCGCAACCU	535	GCAGGUUGCGAGGGUUGUA
343	UUUGAUAGCAGUGGCAAGG	536	CCUUGCCACUGCUAUCAAA
344	AGUAAAUUCCUUAUACCA	537	UGGUGAAUAGGAAGUUAU
345	UCGGGAAUCAGAACUUCGA	538	UCGAAGUUCUGAUUCCCGA
346	CUGCUCACGCCCAUAGC	539	GCUAUUGGGCGUGGAGCAG
347	UGCUCACGCCCAUAGCC	540	GGCUAUUGGGCGUGGAGCA
348	GCUCCACGCCCAUAGCCC	541	GGGCUAUUGGGCGUGGAGC
349	ACGCCCAUAGCCUGAAG	542	CUUCAGGGCUAUUGGGCGU
350	CAUCUUUGGAUAACGACCU	543	AGGUCGUUAUCCAAAGAUG
351	CAAUGCAGUACCCAGACGG	544	CCGUCUGGGUACUGCAUUG
352	AUGCAGUACCCAGACGGAU	545	AUCCGUCUGGGUACUGCAU
353	AGUACCCAGACGGAUUUA	546	UGAAAUCCGUCUGGGUACU
354	CUGUAGCCCCGCACAGUCC	547	GGACUGUGCGGGGCUACAG
355	AUCUUCUUUGAUGCCGGAA	548	UUCGGCAUCAAGAAGAU
356	CUUUGAUGCCGGAAAGCAA	549	UUUGCUUCCGGCAUCAAG
357	GAUGCCGGAAGCAAAGCAU	550	AUGCUUUGCUUCCGGCAUC
358	AUGCCGGAAGCAAAGCAUC	551	GAUGCUUUGCUUCCGGCAU
359	GCCGGAAGCAAAGCAUCCC	552	GGGAUGCUUUGCUUCCGGC
360	CCCCAGAUCACCAUUAC	553	GUAUUGGUGGAUCUGGGGG
361	AGAUCACCAUUACAUUUU	554	AAAUGUAAUGGUGGAUCU
362	AUUUUGGGCCACAAAGUG	555	CACUUUGUGGGCCCAAAU
363	UUUUGGGCCACAAAGUGG	556	CCACUUUGUGGGCCCAAAA
364	UUUGGGCCACAAAGUGGG	557	CCCACUUUGUGGGCCCAAA

365	CCACAAAGUGGGCCGUCGG	558	CCGACGGCCACUUUGUGG
366	CACAAAGUGGGCCGUCGGG	559	CCCGACGGCCACUUUGUG
367	AGUGGGCCGUCGGGGAUCA	560	UGAUCCCCGACGGCCACU
368	AAAGGGUUUUGGGGCUCGA	561	UCGAGCCCCAAAACCCUUU
369	GGCUCGAGGCCCCAGACGUG	562	CACGUCUGGGCCUCGAGCC
370	GCUCGAGGCCCCAGACGUGC	563	GCACGUCUGGGCCUCGAGC
371	CUCGAGGCCCCAGACGUGCU	564	AGCACGUCUGGGCCUCGAG
372	GGUAGCCUCUCCAACAAG	565	CUUGUUGGAGAGGGCUACC
373	CUUUGAUGCCGGACAAGCC	566	GGCUUGUCCGGCAUCAAAAG
374	UUUGAUGCCGGACAAGCCA	567	UGGCUUGUCCGGCAUCAAA
375	UUGAUGCCGGACAAGCCAC	568	GUGGCUUGUCCGGCAUCAAA
376	GGACAAGCCACUGAGCGCA	569	UGCGCUCAGUGGCUUGUCC
377	ACAAGCCACUGAGCGCAAA	570	UUUGCGCUCAGUGGCUUGU
378	GGACUACAGCCUGUCGUCA	571	UGACGACAGGCUGUAGUCC
379	GACUACAGCCUGUCGUCAG	572	CUGACGACAGGCUGUAGUC
380	CUACAGCCUGUCGUCAGCC	573	GGCUGACGACAGGCUGUAG
381	CCUGUCGUCAGCCCACAAG	574	CUUGUGGGCUGACGACAGG
382	GCAUGGCAAGCCGGCUGCU	575	AGCAGCCGGCUUGCCAUGC
383	CUGACCAGAU AUGACUGUG	576	CACAGUCAUAUCUGGCAG
384	GAUAUGACUGUGAGGUGAA	577	UUCACCUCACAGUCAUAUC
385	GGUGAACGUGCCCGUGCUG	578	CAGCACGGGCACGUUACC
386	UACAAGAUGGACUUACCUG	579	CAGGUAAGUCCAUCUUGUA
387	GGACUUACCUGGCAGACUU	580	AAGUCUGCCAGGUAAGUCC
388	UUUUUCUGAGAUGCUCACU	581	AGUGAGCAUCUCAGAAAAA
389	AGUACACAAUUGUUUACC	582	GGUAAAACAAUUGUGUACU
390	ACAAGUUUGGUGCAUGUCU	583	AGACAUGCACCAAACUUGU
391	ACUAAAAAGAUUCCUCGUU	584	AACGAGGAAUCUUUUUAGU
392	AGGGUCAACUCCAACGUAAU	585	AUACGUUGGAGUUGACCCU
393	GGGUCAACUCCAACGUAAUG	586	CAUACGUUGGAGUUGACCC
394	GUCAACUCCAACGUAAUGUG	587	CACAUACGUUGGAGUUGAC
395	UCAACUCCAACGUAAUGUGG	588	CCACAUACGUUGGAGUUGA
396	CAACUCCAACGUAAUGUGGU	589	ACCACAUACGUUGGAGUUG
397	CUCCAACGUAAUGUGGUAAU	590	AUAACCACAUACGUUGGAG
398	UCCAACGUAAUGUGGUAAUC	591	GAUAACCACAUACGUUGGA
399	CCAACGUAAUGUGGUAAUCU	592	AGAUAAACCACAUACGUUGG
400	AACGUAAUGUGGUAAUCUGU	593	ACAGAUAAACCACAUACGUU
401	UUAUAUCUGGGUUAAGUGU	594	ACACUUAACCCAGAUUAAA
402	CCACGGCCUGUACGGACAC	595	GUGUCCGUACAGGCCGUGG
403	ACGGCCUGUACGGACACUG	596	CAGUGUCCGUACAGGCCGU
404	UGUCGGCUUUUUGCCAUCU	597	AGAUGGCAAAAAGCCGACA
405	GUCGGCUUUUUGCCAUCUG	598	CAGAUGGCAAAAAGCCGAC
406	AUCUGUGAU AUGCCAUAGG	599	CCUAUGGCAUAUCACAGAU
407	UGCCAUAAGGUGUGACAAUC	600	GAUUGUCACACCUAUGGCA
408	CCAUAGGUGUGACAAUCCG	601	CGGAUUGUCACACCUAUGG

409	CAUAGGUGUGACAAUCCGA	602	UCGGAUUGUCACACCUAUG
410	AUAGGUGUGACAAUCCGAG	603	CUCGGAUUGUCACACCUAU
411	GGUGUGACAAUCCGAGCAG	604	CUGCUCGGAUUGUCACACC
412	ACAAUCCGAGCAGUGGAGU	605	ACUCCACUGCUCGGAUUGU
413	CCGAGCAGUGGAGUCAUUC	606	GAAUGACUCCACUGCUCGG
414	GGGAGCACUGC CGC GCUAUC	607	GAUAGCGCGCAGUGCUC
415	GGAGCACUGC CGC GCUAUCC	608	GGAUAGCGCGCAGUGCUC
416	AGCACUGC CGC GCUAUCCCC	609	GGGGAUAGCGCGCAGUGC
417	UAUUGCUGCCAAGAGGGGUC	610	GACCCUCUUGGCAGCAAUA
418	GGUCUGAUGGCACGUUGUG	611	CACAACGUGCCAUCAGACC
419	CUGAUGGCACGUUGUGGGG	612	CCCCACAACGUGCCAUCAG
420	GGCACGUUGUGGGGUCGGG	613	CCCGACCCCAACGUGCC
421	GCACGUUGUGGGGUCGGGG	614	CCCGACCCCAACGUGC
422	CACGUUGUGGGGUCGGGGG	615	CCCGACCCCAACGUG
423	GCGGGGAAGUGCUCUAAACU	616	AGUUAGAGCACUUC
424	CGGGGAAGUGCUCUAAACU	617	AAGUUAGAGCACUUC
425	UUAAGGUUUUGUUGCUAGC	618	GCUAGCAACAAAACCUAA
426	GUUGCUGACCCUUAAGUG	619	CACUUGAAGGGCUAGCAAC
427	GAGCUAUGUGACUCGGAUG	620	CAUCCGAGUCACAUAGCUC
428	GCUAUGUGACUCGGAUGGU	621	ACCAUCCGAGUCACAUAGC
429	CGGAUGGUCUUUCACACGG	622	CCGUGUGAAAGACCAUCCG
430	GAUGGUCUUUCACACGGCA	623	UGCCGUGUGAAAGACCAUC
431	UGGUCUUUCACACGGCACA	624	UGUGCCGUGUGAAAGACCA
432	AACUACCAUGAGAUGGUUU	625	AAACCAUCUCAUGGUAGUU
433	UACCAUGAGAUGGUUUAGA	626	UCUAAACCAUCUCAUGGUA
434	CCAAGCUCACGACCUUGGA	627	UCCAAGGUCGUGAGCUUGG
435	ACGACCUUGGAGCCCCGUG	628	CACGGGGCUCCAAGGUUGU
436	GGGUAAGAGGGACGACACC	629	GGUGUCGUCCUCUUACCC
437	GGUAAGAGGGACGACACCU	630	AGGUGUCGUCCUCUUACC
438	GUAAGAGGGACGACACCUC	631	GAGGUGUCGUCCUCUUAC
439	UGGUUUUCAAUACCAAUU	632	AAUUGGUAUUGAAAAACCA
440	UUCAAUACCAAUACAUGG	633	CCAUGUAAUUGGUAUUGAA
441	AUACCAAUACAUGGAACU	634	AGUCCAUGUAAUUGGUAU
442	CCAACUAUUUAGUAAGCCC	635	GGGCUUACUAAUAGUUGG
443	AACUAUUUAGUAAGCCCGG	636	CCGGGCUUACUAAUAGUU
444	ACUAUUUAGUAAGCCCGGA	637	UCCGGGCUUACUAAUAGU
445	AGAAAUCCUUAUGUCAUGG	638	CCAUGACUAAGGAAUUUCU
446	CAUUAAGGGCAUUUACCC	639	GGGUAAAAUGCCCUAAUG
447	UAAGGGCAUUUACCCUUG	640	CAAGGGUAAAAUGCCCUUA
448	AGCUUCAUAUUAACCCUAC	641	GUAGGGUAAUAUGAAGCU
449	UAUUAACCCUACCUUGUCA	642	UUGACAGGUAGGGUAAUA
450	UUAACCCUACCUUGUCAACG	643	CGUUGACAGGUAGGGUAA
451	ACCCUACCUUGUCAACGUAA	644	UUACGUUGACAGGUAGGGU
452	CCCUACCUUGUCAACGUAA	645	GUUACGUUGACAGGUAGGG

453	CCUACCUGUCAACGUAACG	646	CGUUACGUUGACAGGUAGG
454	CUACCUGUCAACGUAACGA	647	UCGUUACGUUGACAGGUAG
455	UACCUGUCAACGUAACGAU	648	AUCGUUACGUUGACAGGUA
456	ACCUGUCAACGUAACGAUU	649	AAUCGUUACGUUGACAGGU
457	CCUGUCAACGUAACGAUUU	650	AAAUCGUUACGUUGACAGG
458	CUGUCAACGUAACGAUUUC	651	GAAAUCGUUACGUUGACAG
459	UGUCAACGUAACGAUUUCA	652	UGAAAUCGUUACGUUGACA
460	UCAACGUAACGAUUUCAUG	653	CAUGAAAUCGUUACGUUGA
461	ACGUAACGAUUUCAUGAAC	654	GUUCAUGAAAUCGUUACGU
462	UAUUAUAUUGUCGAAUUC	655	GGAAUUCGACAAUAUAAUA
463	UUAUAUUGUCGAAUUCUA	656	UAGGAAUUCGACAAUAUAA
464	UAUUGUCGAAUUCUACUG	657	CAGUAGGAAUUCGACAAUA
465	GAAUUCUACUGACAACAU	658	AUGUUGUCAGUAGGAAUUC
466	UCCUACUGACAACAUAUA	659	UAUAAUGUUGUCAGUAGGA
467	UAUAACUGUAUGGGAGCUU	660	AAGCUCCCAUACAGUUUA
468	UAACUGUAUGGGAGCUUAA	661	UUAAGCUCCCAUACAGUUA
469	UGUAUGGGAGCUUAAUUU	662	AAAGUUAAGCUCCCAUACA
470	UUGACACUGGUAUCUUAU	663	AAUAAGAUACCAGUGUCA
471	AAGUAUUCUGAUCCUACCA	664	UGGUAGGAUCAGAAUACUU
472	CAACGUAACGAUUUCAUGAAA	665	UUCAUGAAAUCGUUACGUUGGC
473	UAUAUCAACGUAACGAUUUCAUG AAA	666	UUCAUGAAAUCGUUACGUUGGC
474	UAUAUCAACGUAACGAUUUCAUG AAA	667	UUCAUGAAAUCGUUACGUUGGC AU
475	UAUAUCAACGUAACGAUUUCAUG AAA	668	UUCAUGAAAUCGUUACGUUGGC GU
476	UAUAUCGACGUAACGAUUUCAUG AAA	669	UUCAUGAAAUCGUUACGUUGGC AU
477	UAUACGUAACGAUUUCAUGAAA	670	UUCAUGAAAUCGUUACGU

Таблица 5В

Последовательности РНК-триггера Hif2 α , содержащие модифицированные нуклеотиды

Идентиф. номер дуплекса	SEQ ID No.	Последовательность смысловой цепи (5' → 3')	SEQ ID No.	Последовательность антисмысловой цепи (5' → 3')
2231	671	GfaGfaCfuGfuAfuGfgUfcAfgCfuAfdT	858	dTAfgCfuGfaCfcAfuAfcAfgUfcUfcdTs dT
2232	672	CfuCfcGfaCfuCfcUfuCfcGfaCfuAfdT	859	dTAfgUfcGfgAfaGfgAfgUfcGfgAfgdT dT
2233	673	UfcCfgAfcUfcCfcAfgCfaUfuCfgAfdT	860	dTCfgAfaUfgCfuGfgGfaGfuCfgGfadTs dT
2234	674	CfgAfcUfcCfcAfgCfaUfuCfgAfgAfdT	861	dTCfuCfgAfaUfgCfuGfgGfaGfuCfgdT dT
2235	675	GfaCfuCfcCfaGfcAfuUfcGfaGfcAfdT	862	dTGfcUfcGfaAfuGfcUfgGfgAfgUfcdTs dT

2236	676	CfaGfgUfgCfuCfgGfcGfuCfuGfaAf dT	863	dTUfcAfgAfcGfcCfgAfgCfaCfcUfgdTsd T
2237	677	GfuGfcUfcGfgCfgUfcUfgAfaCfgAf dT	864	dTCfgUfuCfaGfaCfgCfcGfaGfcAfcdTsd T
2238	678	UfcGfgCfgUfcUfgAfaCfgUfcUfcAf dT	865	dTGfaGfaCfgUfuCfaGfaCfgCfcGfadTsd T
2239	679	GfgCfgUfcUfgAfaCfgUfcUfcAfaAf dT	866	dTUfuGfaGfaCfgUfuCfaGfaCfgCfcdTsd T
2240	680	CfgUfcUfgAfaCfgUfcUfcAfaAfgAf dT	867	dTCfuUfuGfaGfaCfgUfuCfaGfaCfgdTsd T
2241	681	AfaAfaGfgAfgUfaGfcUfcGfgAfgA fdT	868	dTCfuCfcGfaGfcUfaCfuCfcUfuUfudTsd T
2242	682	GfgGfuUfuCfaUfuGfcCfgUfgGfuA fdT	869	dTAfcCfaCfgGfcAfaUfgAfaAfcCfcdTsd T
2243	683	UfuCfaUfgGfgAfcUfuAfcAfcAfgA fdT	870	dTCfuGfuGfuAfaGfuCfcCfaUfgAfadTs dT
2244	684	GfgGfaCfuUfaCfaCfaGfgUfgGfaAf dT	871	dTUfcCfaCfcUfgUfgUfaAfgUfcCfcdTsd T
2245	685	AfcAfcAfgGfuGfgAfgCfuAfaCfaAf dT	872	dTUfgUfuAfgCfuCfcAfcCfuGfuGfudTs dT
2246	686	GfaGfcUfaAfcAfgGfaCfaUfaGfuAf dT	873	dTAfcUfaUfgUfcCfuGfuUfaGfcUfcdTs dT
2247	687	GfcUfaAfcAfgGfaCfaUfaGfuAfuAf dT	874	dTAfuAfcUfaUfgUfcCfuGfuUfaGfcdTs dT
2248	688	CfuAfaCfaGfgAfcAfuAfgUfaUfcAf dT	875	dTGfaUfaCfuAfuGfuCfcUfgUfuAfgdTsd dT
2249	689	GfgAfcAfuAfgUfaUfcUfuUfgAfcA fdT	876	dTGfuCfaAfaGfaUfaCfuAfuGfuCfcdTsd T
2250	690	UfcUfuUfgAfcUfuCfaCfuCfaUfcAf dT	877	dTGfaUfgAfgUfgAfaGfuCfaAfaGfadTs dT
2251	691	UfcAfcUfcAfuCfcCfuGfcGfaCfcAf dT	878	dTGfgUfcGfcAfgGfgAfuGfaGfuGfadTs dT
2252	692	GfaGfaUfuCfgUfgAfgAfaCfcUfgAf dT	879	dTCfaGfgUfuCfuCfaCfgAfaUfcUfcdTsd T
2253	693	UfuCfgUfgAfgAfaCfcUfgAfgUfcA fdT	880	dTGfaCfuCfaGfgUfuCfuCfaCfgAfadTsd T
2254	694	UfcGfuGfaGfaAfcCfuGfaGfuCfuAf dT	881	dTAfgAfcUfcAfgGfuUfcUfcAfcGfadTs dT
2255	695	GfaCfaUfgUfcCfaCfaGfaGfcGfgAf dT	882	dTCfcGfcUfcUfgUfgGfaCfaUfgUfcdTsd T
2256	696	GfcGfgGfaCfuUfcUfuCfaUfgAfgAf dT	883	dTCfuCfaUfgAfaGfaAfgUfcCfcGfcdTsd T
2257	697	GfgAfuGfaAfgUfgCfaCfgGfuCfaAf dT	884	dTUfgAfcCfgUfgCfaCfuUfcAfuCfcdTsd T
2258	698	CfaCfgGfuCfaCfcAfaCfaGfaGfgAf dT	885	dTCfcUfcUfgUfuGfgUfgAfcCfgUfgdTsd dT
2259	699	UfcAfcCfaAfcAfgAfgGfcCfgUfaAf dT	886	dTUfaCfgGfcCfuCfuGfuUfgGfuGfadTs dT
2260	700	CfaCfcAfaCfaGfaGfgCfcGfuAfcAf dT	887	dTGfuAfcGfgCfcUfcUfgUfuGfgUfgdTsd dT
2261	701	AfgGfcCfgUfaCfuGfuCfaAfcCfuAf dT	888	dTAfgGfuUfgAfcAfgUfaCfgGfcCfudTs dT
2262	702	UfcCfuCfaCfaAfuAfgUfcUfgUfgAf dT	889	dTCfaCfaGfaCfuAfuUfgUfgAfgGfadTs dT

2263	703	AfaUfaGfuCfuGfuGfuGfgCfuAfcAfdT	890	dTGfuAfgCfcAfcAfcAfgAfcUfaUfudTs dT
2264	704	CfaGfaAfcUfgAfuUfgGfuUfaCfcAfdT	891	dTGfgUfaAfcCfaAfuCfaGfuUfcUfgdTsdT
2265	705	AfgAfaCfuGfaUfuGfgUfuAfcCfaAfdT	892	dTUfgGfuAfaCfcAfaUfcAfgUfuCfudTs dT
2266	706	CfuGfaUfuGfgUfuAfcCfaCfcCfuAfdT	893	dTAfgGfgUfgGfuAfaCfcAfaUfcAfgdTsdT
2267	707	UfuGfgCfcGfcUfcAfgCfcUfaUfgAfdT	894	dTCfaUfaGfgCfuGfaGfcGfgCfcAfadTsdT
2268	708	UfaUfgAfaUfuCfuAfcCfaUfgCfgAfdT	895	dTCfgCfaUfgGfuAfgAfaUfuCfaUfadTsdT
2269	709	AfuGfaAfuUfcUfaCfcAfuGfcGfcAfdT	896	dTGfcGfcAfuGfgUfaGfaAfuUfcAfu dTsdT
2270	710	UfgAfaUfuCfuAfcCfaUfgCfgCfuAfdT	897	dTAfgCfgCfaUfgGfuAfgAfaUfuCfadTsdT
2271	711	GfaAfuUfcUfaCfcAfuGfcGfcUfaAfdT	898	dTUfaGfcGfcAfuGfgUfaGfaAfuUfcdTsdT
2272	712	AfaUfuCfuAfcCfaUfgCfgCfuAfgAfdT	899	dTCfuAfgCfgCfaUfgGfuAfgAfaUfu dTsdT
2273	713	UfcUfaCfcAfuGfcGfcUfaGfaCfuAfdT	900	dTAfgUfcUfaGfcGfcAfuGfgUfaGfadTsdT
2274	714	AfuGfcGfcUfaGfaCfuCfcGfaGfaAfdT	901	dTUfcUfcGfgAfgUfcUfaGfcGfcAfu dTsdT
2275	715	UfgCfgCfuAfgAfcUfcCfgAfgAfaAfdT	902	dTUfuCfuCfgGfaGfuCfuAfgCfgCfadTsdT
2276	716	GfuAfaGfuGfgCfcAfgUfaCfcGfgAfdT	903	dTCfcGfgUfaCfuGfgCfcAfcUfuAfc dTsdTsdT
2277	717	UfaAfgUfgGfcCfaGfuAfcCfgGfaAfdT	904	dTUfcCfgGfuAfcUfgGfcCfaCfuUfadTsdT
2278	718	CfcAfgUfaCfcGfgAfuGfcUfcGfcAfdT	905	dTGfcGfaGfcAfuCfcGfgUfaCfuGfgdTsdT
2279	719	AfgUfaCfcGfgAfuGfcUfcGfcAfaAfdT	906	dTUfuGfcGfaGfcAfuCfcGfgUfaCfu dTsdT
2280	720	UfaCfcGfgAfuGfcUfcGfcAfaAfgAfdT	907	dTCfuUfuGfcGfaGfcAfuCfcGfgUfadTsdT
2281	721	UfgCfuCfgCfaAfaGfcAfuGfgGfgAfdT	908	dTCfcCfcAfuGfcUfuUfgCfgAfgCfadTsdT
2282	722	CfgCfaAfaGfcAfuGfgGfgGfcUfaAfdT	909	dTUfaGfcCfcCfcAfuGfcUfuUfgCfgdTsdT
2283	723	AfgCfaUfgGfgGfgCfuAfcGfuGfuAfdT	910	dTAfcAfcGfuAfgCfcCfcCfaUfgCfu dTsdT
2284	724	GfcAfuGfgGfgGfcUfaCfgUfgUfgAfdT	911	dTCfaCfaCfgUfaGfcCfcCfcAfuGfdTsdT
2285	725	CfaUfcUfaCfaAfcCfcUfcGfcAfaAfdT	912	dTUfuGfcGfaGfgGfuUfgUfaGfaUfgdTsdT
2286	726	AfuCfuAfcAfaCfcCfuCfgCfaAfcAfdT	913	dTGfuUfgCfgAfgGfgUfuGfuAfgAfu dTsdT
2287	727	CfuAfcAfaCfcCfuCfgCfaAfcCfuAfdT	914	dTAfgGfuUfgCfgAfgGfgUfuGfuAfgdTsdT
2288	728	UfaCfaAfcCfcUfcGfcAfaCfcUfgAfdT	915	dTCfaGfgUfuGfcGfaGfgGfuUfgUfadTsdT
2289	729	UfuUfgAfuAfgCfaGfuGfgCfaAfgAfdT	916	dTCfuUfgCfcAfcUfgCfuAfuCfaAfadTsdT

2290	730	AfgUfaAfcUfuCfcUfaUfuCfaCfcAf dT	917	dTGfgUfgAfaUfaGfgAfaGfuUfaCfudTs dT
2291	731	UfcGfgGfaAfuCfaGfaAfcUfuCfgAf dT	918	dTCfgAfaGfuUfcUfgAfuUfcCfcGfadTs dT
2292	732	CfuGfcUfcCfaCfcCfaAfuAfgAf dT	919	dTCfuAfuUfgGfgCfgUfgGfaGfcAfgdT dT
2293	733	UfgCfuCfcAfcGfcCfcAfaUfaGfcAf dT	920	dTGfcUfaUfuGfgGfcGfuGfgAfgCfadTs dT
2294	734	GfcUfcCfaCfcCfcCfaAfuAfgCfcAf dT	921	dTGfgCfuAfuUfgGfgCfgUfgGfaGfadTs dT
2295	735	AfcGfcCfcAfaUfaGfcCfcUfgAfaAf dT	922	dTUfuCfaGfgGfcUfaUfuGfgGfcGfudTs dT
2296	736	CfaUfcUfuUfgGfaUfaAfcGfaCfcAf dT	923	dTGfgUfcGfuUfaUfcCfaAfaGfaUfgdT dT
2297	737	CfaAfuGfcAfgUfaCfcCfaGfaCfgAf dT	924	dTCfgUfcUfgGfgUfaCfuGfcAfuUfgdT dT
2298	738	AfuGfcAfgUfaCfcCfaGfaCfgGfaAf dT	925	dTUfcCfgUfcUfgGfgUfaCfuGfcAfuTdTs dT
2299	739	AfgUfaCfcCfaGfaCfgGfaUfuUfcAf dT	926	dTGfaAfaUfcCfgUfcUfgGfgUfaCfudTs dT
2300	740	CfuGfuAfgCfcCfcGfcAfcAfgUfcAf dT	927	dTGfaCfuGfuGfcGfgGfgCfuAfcAfgdT dT
2301	741	AfuCfuUfcUfuUfgAfuGfcCfgGfaA fdT	928	dTUfcCfgGfcAfuCfaAfaGfaAfgAfuTdTs dT
2302	742	CfuUfuGfaUfgCfcGfgAfaGfcAfaAf dT	929	dTUfuGfcUfuCfcGfgCfaUfcAfaAfgdT dT
2303	743	GfaUfgCfcGfgAfaGfcAfaAfgCfaAf dT	930	dTUfgCfuUfuGfcUfuCfcGfgCfaUfcdTs dT
2304	744	AfuGfcCfgGfaAfgCfaAfaGfcAfuAf dT	931	dTAfuGfcUfuUfgCfuUfcCfgGfcAfuTdTs dT
2305	745	GfcCfgGfaAfgCfaAfaGfcAfuCfcAf dT	932	dTGfgAfuGfcUfuUfgCfuUfcCfgGfadTs dT
2306	746	CfcCfcCfaGfaUfcCfaCfcAfuUfaAf dT	933	dTUfaAfuGfgUfgGfaUfcUfgGfgGfgdT dT
2307	747	AfgAfuCfcAfcCfaUfuAfcAfuUfuAf dT	934	dTAfaAfuGfuAfaUfgGfuGfgAfuCfudTs dT
2308	748	AfuUfuUfgGfgCfcCfaCfaAfaGfuAf dT	935	dTAfcUfuUfgUfgGfgCfcCfaAfaAfuTdTs dT
2309	749	UfuUfuGfgGfcCfcAfcAfaAfgUfgA fdT	936	dTCfaCfuUfuGfuGfgGfcCfcAfaAfadTsd T
2310	750	UfuUfgGfgCfcCfaCfaAfaGfuGfgAf dT	937	dTCfcAfcUfuUfgUfgGfgCfcCfaAfadTsd T
2311	751	CfcAfcAfaAfgUfgGfgCfcGfuCfgAf dT	938	dTCfgAfcGfgCfcCfaCfuUfuGfuGfgdT dT
2312	752	CfaCfaAfaGfuGfgGfcCfgUfcGfgAf dT	939	dTCfcGfaCfgGfcCfcAfcUfuUfgUfgdTsd T
2313	753	AfgUfgGfgCfcGfuCfgGfgGfaUfcA fdT	940	dTGfaUfcCfcCfgAfcGfgCfcCfaCfudTsd T
2314	754	AfaAfgGfgUfuUfuGfgGfgCfuCfgA fdT	941	dTCfgAfgCfcCfcAfaAfaCfcCfuUfudTsd T
2315	755	GfgCfuCfgAfgGfcCfcAfgAfcGfuAf dT	942	dTAfcGfuCfuGfgGfcCfuCfgAfgCfedTs dT
2316	756	GfcUfcGfaGfgCfcCfaGfaCfgUfgAf dT	943	dTCfaCfgUfcUfgGfgCfcUfcGfaGfadTsd T

2317	757	CfuCfgAfgGfcCfcAfgAfcGfuGfcAf dT	944	dTGfcAfcGfuCfuGfgGfcCfuCfgAfgdT s
2318	758	GfgUfaGfcCfcUfcUfcCfaAfcAfaAf dT	945	dTUfuGfuUfgGfaGfaGfgGfcUfaCfdTs dT
2319	759	CfuUfuGfaUfgCfcGfgAfcAfaGfcAf dT	946	dTGfcUfuGfuCfcGfgCfaUfcAfaAfgdT s
2320	760	UfuUfgAfuGfcCfcGfaCfaAfgCfcAf dT	947	dTGfgCfuUfgUfcCfcGfcAfuCfaAfdTs dT
2321	761	UfuGfaUfgCfcGfgAfcAfaGfcCfaAf dT	948	dTUfgGfcUfuGfuCfcGfgCfaUfcAfdTs dT
2322	762	GfgAfcAfaGfcCfaCfuGfaGfcGfcAf dT	949	dTGfcGfcUfcAfgUfgGfcUfuGfuCfdTs dT
2323	763	AfcAfaGfcCfaCfuGfaGfcGfcAfaAf dT	950	dTUfuGfcGfcUfcAfgUfgGfcUfuGfuTdTs dT
2324	764	GfgAfcUfaCfaGfcCfuGfuCfcUfcAf dT	951	dTGfaCfcAfcAfgGfcUfgUfaGfuCfdTs dT
2325	765	GfaCfuAfcAfgCfcUfgUfcGfuCfaAf dT	952	dTUfgAfcGfaCfaGfgCfuGfuAfgUfdTs dT
2326	766	CfuAfcAfgCfcUfgUfcGfuCfaGfcAf dT	953	dTGfcUfgAfcGfaCfaGfgCfuGfuAfgdT s
2327	767	CfcUfgUfcGfuCfaGfcCfcAfcAfaAf dT	954	dTUfuGfuGfgGfcUfgAfcGfaCfaGfgdT s
2328	768	GfcAfuGfgCfaAfgCfcGfgCfuGfcAf dT	955	dTGfcAfgCfcGfgCfuUfgCfcAfuGfdTs dT
2329	769	CfuGfaCfcAfgAfuAfuGfaCfuGfuAf dT	956	dTAfcAfgUfcAfuAfuCfuGfgUfcAfgdT s
2330	770	GfaUfaUfgAfcUfgUfgAfgGfuGfaA fdT	957	dTUfcAfcCfuCfaCfaGfuCfaUfaUfdTs dT
2331	771	GfgUfgAfaCfcUfgCfcCfcUfgCfuAf dT	958	dTAfgCfaCfcGfgCfaCfcUfuCfaCfdTs dT
2332	772	UfaCfaAfgAfuGfgAfcUfuAfcCfuAf dT	959	dTAfgGfuAfaGfuCfcAfuCfuUfgUfdTs dT
2333	773	GfgAfcUfuAfcCfuGfgCfaGfaCfuAf dT	960	dTAfgUfcUfgCfcAfgGfuAfaGfuCfdTs dT
2334	774	UfuUfuUfcUfgAfgAfuGfcUfcAfcA fdT	961	dTGfuGfaGfcAfuCfuCfaGfaAfaAfdTs dT
2335	775	AfgUfaCfaCfaAfuUfgUfuUfuAfcAf dT	962	dTGfuAfaAfaCfaAfuUfgUfgUfaCfdTs dT
2336	776	AfcAfaGfuUfuGfgUfgCfaUfgUfcA fdT	963	dTGfaCfaUfgCfaCfcAfaAfcUfuGfuTdTs dT
2337	777	AfcUfaAfaAfaGfaUfuCfcUfcGfuAf dT	964	dTAfcGfaGfgAfaUfcUfuUfuUfaGfuTdTs dT
2338	778	AfgGfgUfcAfaCfuCfcAfaCfcUfaAf dT	965	dTUfaCfcUfuGfgAfgUfuGfaCfcCfdTs dT
2339	779	GfgGfuCfaAfcUfcCfaAfcGfuAfuAf dT	966	dTAfuAfcGfuUfgGfaGfuUfgAfcCfdTs dT
2340	780	GfuCfaAfcUfcCfaAfcGfuAfuGfuAf dT	967	dTAfcAfuAfcGfuUfgGfaGfuUfgAfdTs dT
2341	781	UfcAfaCfuCfcAfaCfcUfaUfgUfgAf dT	968	dTCfaCfaUfaCfcUfuGfgAfgUfuGfadTs dT
2342	782	CfaAfcUfcCfaAfcGfuAfuGfuGfgAf dT	969	dTCfcAfcAfuAfcGfuUfgGfaGfuUfgdT s
2343	783	CfuCfcAfaCfcUfaUfgUfgGfuUfaAf dT	970	dTUfaAfcCfaCfaUfaCfcUfuGfgAfgdT s

2344	784	UfcCfaAfcGfuAfuGfuGfgUfuAfuAfdT	971	dTAfuAfaCfcAfcAfuAfcGfuUfgGfadTs dT
2345	785	CfcAfaCfgUfaUfgUfgGfuUfaUfcAfdT	972	dTGfaUfaAfcCfaCfaUfaCfgUfuGfgdTsdT
2346	786	AfaCfgUfaUfgUfgGfuUfaUfcUfgAfdT	973	dTCfaGfaUfaAfcCfaCfaUfaCfgUfudTsdT
2347	787	UfuAfuAfuCfuGfgGfuUfaAfgUfgAfdT	974	dTCfaCfuUfaAfcCfcAfgAfuAfuAfdTsdT
2348	788	CfcAfcGfgCfcUfgUfaCfgGfaCfaAfdT	975	dTUfgUfcCfgUfaCfaGfgCfcGfuGfgdTsdT
2349	789	AfcGfgCfcUfgUfaCfgGfaCfaCfuAfdT	976	dTAfgUfgUfcCfgUfaCfaGfgCfcGfuTdTs dT
2350	790	UfgUfcGfgCfuUfuUfuGfcCfaUfcAfdT	977	dTGfaUfgGfcAfaAfaAfgCfcGfaCfadTsdT
2351	791	GfuCfgGfcUfuUfuUfgCfcAfuCfuAfdT	978	dTAfgAfuGfgCfaAfaAfaGfcCfcAfdTs dT
2352	792	AfuCfuGfuGfaUfaUfgCfcAfuAfgAfdT	979	dTCfuAfuGfgCfaUfaUfcAfcAfgAfuTdTs dT
2353	793	UfgCfcAfuAfgGfuGfuGfaCfaAfuAfdT	980	dTAfuUfgUfcAfcAfcCfuAfuGfgCfadTs dT
2354	794	CfcAfuAfgGfuGfuGfaCfaAfuCfcAfdT	981	dTGfgAfuUfgUfcAfcAfcCfuAfuGfgdTsdT
2355	795	CfaUfaGfgUfgUfgAfcAfaUfcCfgAfdT	982	dTCfgGfaUfuGfuCfaCfaCfcUfaUfgdTsdT
2356	796	AfuAfgGfuGfuGfaCfaAfuCfcGfaAfdT	983	dTUfcGfgAfuUfgUfcAfcAfcCfuAfuTdTs dT
2357	797	GfgUfgUfgAfcAfaUfcCfgAfgCfaAfdT	984	dTUfgCfuCfgGfaUfuGfuCfaCfaCfdTsdT
2358	798	AfcAfaUfcCfgAfgCfaGfuGfgAfgAfdT	985	dTCfuCfcAfcUfgCfuCfgGfaUfuGfuTdTs dT
2359	799	CfcGfaGfcAfgUfgGfaGfuCfaUfuAfdT	986	dTAfaUfgAfcUfcCfaCfuGfcUfcGfgdTsdT
2360	800	GfgGfaGfcAfcUfgCfgCfcCfuAfuAfdT	987	dTAfuAfgCfcCfcCfaGfuGfcUfcCfdTsdT
2361	801	GfgAfgCfaCfuGfcGfcGfcUfaUfcAfdT	988	dTGfaUfaGfcGfcGfcAfgUfgCfuCfdTsdT
2362	802	AfgCfaCfuGfcGfcGfcUfaUfcCfcAfdT	989	dTGfgGfaUfaGfcGfcGfcAfgUfgCfuTdTs dT
2363	803	UfaUfuGfcUfgCfcAfaGfaGfgGfuAfdT	990	dTAfcCfcUfcUfuGfgCfaGfcAfaUfadTsdT
2364	804	GfgUfcUfgAfuGfgCfaCfgUfuGfuAfdT	991	dTAfcAfaCfgUfgCfcAfuCfaGfaCfdTsdT
2365	805	CfuGfaUfgGfcAfcGfuUfgUfgGfgAfdT	992	dTCfcCfaCfaAfcGfuGfcCfaUfcAfgdTsdT
2366	806	GfgCfaCfgUfuGfuGfgGfgUfcGfgAfdT	993	dTCfcGfaCfcCfcAfcAfaCfgUfgCfdTsdT
2367	807	GfcAfcGfuUfgUfgGfgGfuCfgGfgAfdT	994	dTCfcCfgAfcCfcCfaCfaAfcGfuGfdTsdT
2368	808	CfaCfgUfuGfuGfgGfgUfcGfgGfgAfdT	995	dTCfcCfcGfaCfcCfcAfcAfaCfgUfgdTsdT
2369	809	GfcGfgGfgAfaGfuGfcUfcUfaAfcAfdT	996	dTGfuUfaGfaGfcAfcUfuCfcCfcGfdTsdT
2370	810	CfgGfgGfaAfgUfgCfuCfuAfaCfuAfdT	997	dTAfgUfuAfgAfgCfaCfuUfcCfcCfdTs dT

2371	811	UfuAfaGfgUfuUfuGfuUfgCfuAfgAfdT	998	dTCfuAfgCfaAfcAfaAfaCfcUfuAfadTsdT
2372	812	GfuUfgCfuAfgCfcCfuUfcAfaGfuAfdT	999	dTAfcUfuGfaAfgGfgCfuAfgCfaAfdTs dT
2373	813	GfaGfcUfaUfgUfgAfcUfcGfgAfuAfdT	1000	dTAfuCfcGfaGfuCfaCfaUfaGfcUfdTsdT
2374	814	GfcUfaUfgUfgAfcUfcGfgAfuGfgAfdT	1001	dTCfcAfuCfcGfaGfuCfaCfaUfaGfdTsdT
2375	815	CfgGfaUfgGfuCfuUfuCfaCfaCfgAfdT	1002	dTCfgUfgUfgAfaAfgAfcCfaUfcCfgdTs dT
2376	816	GfaUfgGfuCfuUfuCfaCfaCfgGfcAfdT	1003	dTGfcCfgUfgUfgAfaAfgAfcCfaUfdTs dT
2377	817	UfgGfuCfuUfuCfaCfaCfgGfcAfcAfdT	1004	dTGfuGfcCfgUfgUfgAfaAfgAfcCfadTs dT
2378	818	AfaCfuAfcCfaUfgAfgAfuGfgUfuAfdT	1005	dTAfaCfcAfuCfuCfaUfgGfuAfgUfu dTs dT
2379	819	UfaCfcAfuGfaGfaUfgGfuUfuAfgAfdT	1006	dTCfuAfaAfcCfaUfcUfcAfuGfgUfadTsdT
2380	820	CfcAfaGfcUfcAfcGfaCfcUfuGfgAfdT	1007	dTCfcAfaGfgUfcGfuGfaGfcUfuGfgdTs dT
2381	821	AfcGfaCfcUfuGfgAfgCfcCfcGfuAfdT	1008	dTAfcGfgGfgCfuCfcAfaGfgUfcGfudTs dT
2382	822	GfgGfuAfaGfaGfgGfaCfgAfcAfcAfdT	1009	dTGfuGfuCfgUfcCfcUfcUfuAfcCfdTsdT
2383	823	GfgUfaAfgAfgGfgAfcGfaCfaCfcAfdT	1010	dTGfgUfgUfcGfuCfcCfuCfuUfaCfdTsdT
2384	824	GfuAfaGfaGfgGfaCfgAfcAfcCfuAfdT	1011	dTAfgGfuGfuCfgUfcCfcUfcUfuAfdTs dT
2385	825	UfgGfuUfuUfuCfaAfuAfcCfaAfuAfdT	1012	dTAfuUfgGfuAfuUfgAfaAfaAfcCfadTs dT
2386	826	UfuCfaAfuAfcCfaAfuUfaCfaUfgAfdT	1013	dTCfaUfgUfaAfuUfgGfuAfuUfgAfdTs dT
2387	827	AfuAfcCfaAfuUfaCfaUfgGfaAfcAfdT	1014	dTGfuUfcCfaUfgUfaAfuUfgGfuAfu dTs dT
2388	828	CfcAfaCfuAfuUfuAfgUfaAfgCfcAfdT	1015	dTGfgCfuUfaCfuAfaAfuAfgUfuGfgdTs dT
2389	829	AfaCfuAfuUfuAfgUfaAfgCfcCfgAfdT	1016	dTCfgGfgCfuUfaCfuAfaAfuAfgUfu dTs dT
2390	830	AfcUfaUfuUfaGfuAfaGfcCfcGfgAfdT	1017	dTCfcGfgGfcUfuAfcUfaAfaUfaGfudTs dT
2391	831	AfgAfaAfuUfcCfuUfaGfuCfaUfgAfdT	1018	dTCfaUfgAfcUfaAfgGfaAfuUfuCfudTs dT
2392	832	CfaUfuAfaGfgGfcAfuUfuUfaCfcAfdT	1019	dTGfgUfaAfaAfuGfcCfcUfuAfaUfgdTs dT
2393	833	UfaAfgGfgCfaUfuUfuAfcCfcUfuAfdT	1020	dTAfaGfgGfuAfaAfaUfgCfcCfuUfadTs dT
2394	834	AfgCfuUfcAfuAfuUfaAfcCfcUfaAfdT	1021	dTUfaGfgGfuUfaAfuAfuGfaAfgCfudTs dT
2395	835	UfaUfuAfaCfcCfuAfcCfuGfuCfaAfdT	1022	dTUfgAfcAfgGfuAfgGfgUfuAfaUfadTs dT
2396	836	UfuAfaCfcCfuAfcCfuGfuCfaAfcAfdT	1023	dTGfuUfgAfcAfgGfuAfgGfgUfuAfadTs dT
2397	837	AfcCfcUfaCfcUfgUfcAfaCfgUfaAfdT	1024	dTUfaCfgUfuGfaCfaGfgUfaGfgGfudTs dT

2398	838	CfcCfuAfcCfuGfuCfaAfcGfuAfaAf dT	1025	dTUfuAfcGfuUfgAfcAfgGfuAfgGfgdT dT
2399	839	CfcUfaCfcUfgUfcAfaCfgUfaAfcAf dT	1026	dTGfuUfaCfgUfuGfaCfaGfgUfaGfgdT dT
2400	840	CfuAfcCfuGfuCfaAfcGfuAfaCfgAf dT	1027	dTCfgUfuAfcGfuUfgAfcAfgGfuAfgdT dT
2401	841	UfaCfcUfgUfcAfaCfgUfaAfcGfaAf dT	1028	dTUfcGfuUfaCfgUfuGfaCfaGfgUfadTs dT
2402	842	AfcCfuGfuCfaAfcGfuAfaCfgAfuAf dT	1029	dTAfuCfgUfuAfcGfuUfgAfcAfgGfuTs dT
2403	843	CfcUfgUfcAfaCfgUfaAfcGfaUfuAf dT	1030	dTAfaUfcGfuUfaCfgUfuGfaCfaGfgdT dT
2404	844	CfuGfuCfaAfcGfuAfaCfgAfuUfuAf dT	1031	dTAfaAfuCfgUfuAfcGfuUfgAfcAfgdT dT
2405	845	UfgUfcAfaCfgUfaAfcGfaUfuUfcAf dT	1032	dTGfaAfaUfcGfuUfaCfgUfuGfaCfadTs T
2406	846	UfcAfaCfgUfaAfcGfaUfuUfcAfuAf dT	1033	dTAfuGfaAfaUfcGfuUfaCfgUfuGfadTs dT
2407	847	AfcGfuAfaCfgAfuUfuCfaUfgAfaAf dT	1034	dTUfuCfaUfgAfaAfuCfgUfuAfcGfuTs dT
2408	848	UfaUfuAfuAfuUfgUfcGfaAfuUfcA fdT	1035	dTGfaAfuUfcGfaCfaAfuAfaUfadTs dT
2409	849	UfuAfuAfuUfgUfcGfaAfuUfcCfuA fdT	1036	dTAfgGfaAfuUfcGfaCfaAfuAfaUfadTs dT
2410	850	UfaUfuGfuCfgAfaUfuCfcUfaCfuAf dT	1037	dTAfgUfaGfgAfaUfuCfgAfaUfadTs dT
2411	851	GfaAfuUfcCfuAfcUfgAfcAfaCfaAf dT	1038	dTUfgUfuGfuCfaGfuAfgGfaUfcTs dT
2412	852	UfcCfuAfcUfgAfcAfaCfaUfuAfuAf dT	1039	dTAfuAfaUfgUfuGfuCfaGfuAfgGfadTs dT
2413	853	UfaUfaAfcUfgUfaUfgGfgAfgCfuA fdT	1040	dTAfgCfuCfcCfaUfaCfaGfuUfaUfadTs T
2414	854	UfaAfcUfgUfaUfgGfgAfgCfuUfaA fdT	1041	dTUfaAfgCfuCfcCfaUfaCfaGfuUfadTs T
2415	855	UfgUfaUfgGfgAfgCfuUfaAfcUfuA fdT	1042	dTAfaGfuUfaAfgCfuCfcCfaUfaCfadTs T
2416	856	UfuGfaCfaCfuGfgUfaUfcUfuAfuAf dT	1043	dTAfuAfaGfaUfaCfcAfgUfgUfcAfadTs dT
2417	857	AfaGfuAfuUfcUfgAfuCfcUfaCfcAf dT	1044	dTGfgUfaGfgAfuCfaGfaAfuAfcUfuTs dT

Таблица 5С

Результаты скрининга эффективности РНКи-триггеров Hif2 α in vitro, который проводили путем анализа репортерного гена двойной люциферазы

Номер дуплекса	Относительно R _{люц} -Hif2 α		Номер АД	Относительно R _{люц} -Hif2 α	
	1 нМ	0,1 нМ		1 нМ	0,1 нМ
2231	0,491 ± 0,198	0,544 ± 0,368	2325	1,379 ± 0,275	1,304 ± 0,134
2232	0,468 ± 0,032	0,684 ± 0,061	2326	0,546 ± 0,083	0,660 ± 0,114
2233	0,862 ± 0,125	0,913 ± 0,019	2327	1,073 ± 0,089	1,339 ± 0,179
2234	0,388 ± 0,046	0,508 ± 0,148	2328	1,192 ± 0,144	1,291 ± 0,109
2235	0,857 ± 0,090	0,743 ± 0,129	2329	0,456 ± 0,064	0,807 ± 0,117

2236	0,761 ± 0,042	0,693 ± 0,071	2330	0,464 ± 0,035	1,097 ± 0,416
2237	0,978 ± 0,083	0,746 ± 0,029	2331	0,783 ± 0,080	1,002 ± 0,321
2238	0,148 ± 0,024	0,208 ± 0,023	2332	0,871 ± 0,235	1,174 ± 0,027
2239	0,157 ± 0,017	0,225 ± 0,022	2333	0,291 ± 0,019	0,684 ± 0,147
2240	0,845 ± 0,052	0,841 ± 0,048	2334	0,389 ± 0,044	0,672 ± 0,082
2241	0,270 ± 0,068	0,385 ± 0,028	2335	0,104 ± 0,013	0,311 ± 0,032
2242	0,222 ± 0,064	0,411 ± 0,019	2336	0,299 ± 0,034	0,783 ± 0,037
2243	0,694 ± 0,107	0,688 ± 0,059	2337	0,131 ± 0,033	0,334 ± 0,066
2244	0,915 ± 0,115	0,760 ± 0,050	2338	0,334 ± 0,091	0,743 ± 0,070
2245	0,727 ± 0,066	0,761 ± 0,039	2339	0,189 ± 0,028	0,523 ± 0,134
2246	0,327 ± 0,042	0,509 ± 0,044	2340	0,444 ± 0,039	0,920 ± 0,114
2247	0,231 ± 0,048	0,439 ± 0,082	2341	0,202 ± 0,018	0,378 ± 0,116
2248	0,148 ± 0,036	0,215 ± 0,007	2342	0,549 ± 0,041	1,058 ± 0,064
2249	0,190 ± 0,028	0,303 ± 0,042	2343	0,254 ± 0,009	0,620 ± 0,208
2250	0,139 ± 0,046	0,255 ± 0,020	2344	0,276 ± 0,033	0,570 ± 0,071
2251	0,872 ± 0,121	0,857 ± 0,087	2345	0,129 ± 0,026	0,296 ± 0,096
2252	0,592 ± 0,061	0,696 ± 0,096	2346	0,273 ± 0,012	0,523 ± 0,133
2253	0,564 ± 0,043	0,646 ± 0,144	2347	0,530 ± 0,040	0,753 ± 0,092
2254	0,641 ± 0,054	0,756 ± 0,080	2348	0,454 ± 0,096	0,840 ± 0,270
2255	0,721 ± 0,055	0,653 ± 0,130	2349	0,504 ± 0,062	0,674 ± 0,172
2256	0,765 ± 0,124	0,796 ± 0,028	2350	0,678 ± 0,105	0,755 ± 0,085
2257	0,802 ± 0,044	0,647 ± 0,127	2351	1,306 ± 0,216	1,216 ± 0,415
2258	0,972 ± 0,168	0,882 ± 0,098	2352	0,749 ± 0,049	1,012 ± 0,048
2259	0,836 ± 0,110	0,743 ± 0,086	2353	0,324 ± 0,075	0,635 ± 0,156
2260	1,030 ± 0,187	0,861 ± 0,031	2354	0,741 ± 0,189	1,043 ± 0,239
2261	0,657 ± 0,067	0,568 ± 0,065	2355	0,248 ± 0,063	0,457 ± 0,066
2262	0,277 ± 0,071	0,755 ± 0,031	2356	0,210 ± 0,023	0,574 ± 0,006
2263	0,875 ± 0,059	1,126 ± 0,083	2357	0,435 ± 0,062	0,737 ± 0,082
2264	0,183 ± 0,019	0,381 ± 0,023	2358	0,731 ± 0,123	0,647 ± 0,113
2265	0,186 ± 0,045	0,448 ± 0,042	2359	0,354 ± 0,022	0,576 ± 0,208
2266	0,368 ± 0,046	0,808 ± 0,062	2360	0,962 ± 0,167	1,102 ± 0,119
2267	0,651 ± 0,049	1,029 ± 0,104	2361	0,603 ± 0,133	0,800 ± 0,198
2268	0,210 ± 0,037	0,409 ± 0,023	2362	0,454 ± 0,069	0,673 ± 0,089
2269	0,302 ± 0,080	0,530 ± 0,097	2363	0,452 ± 0,091	0,653 ± 0,199
2270	0,613 ± 0,147	0,658 ± 0,149	2364	0,855 ± 0,282	1,070 ± 0,042
2271	0,930 ± 0,094	1,056 ± 0,291	2365	1,259 ± 0,247	1,132 ± 0,107
2272	0,864 ± 0,197	1,028 ± 0,281	2366	0,695 ± 0,115	0,879 ± 0,223
2273	0,588 ± 0,057	0,574 ± 0,033	2367	0,376 ± 0,039	0,665 ± 0,064
2274	0,506 ± 0,074	0,870 ± 0,108	2368	1,140 ± 0,221	1,036 ± 0,063
2275	0,464 ± 0,048	0,515 ± 0,264	2369	0,338 ± 0,055	0,464 ± 0,032
2276	0,330 ± 0,080	0,543 ± 0,029	2370	0,294 ± 0,026	0,498 ± 0,128
2277	0,702 ± 0,091	0,625 ± 0,384	2371	0,166 ± 0,037	0,193 ± 0,030
2278	0,564 ± 0,070	0,947 ± 0,044	2372	0,514 ± 0,044	0,831 ± 0,103
2279	0,280 ± 0,042	0,506 ± 0,086	2373	0,162 ± 0,032	0,369 ± 0,082
2280	0,911 ± 0,086	0,871 ± 0,147	2374	0,192 ± 0,014	0,355 ± 0,020
2281	0,651 ± 0,041	0,914 ± 0,177	2375	0,305 ± 0,040	0,481 ± 0,062
2282	0,824 ± 0,155	1,209 ± 0,132	2376	0,228 ± 0,029	0,546 ± 0,115
2283	0,882 ± 0,026	1,175 ± 0,194	2377	0,958 ± 0,189	0,900 ± 0,189
2284	0,787 ± 0,062	1,227 ± 0,266	2378	0,734 ± 0,170	0,994 ± 0,246
2285	0,723 ± 0,088	1,109 ± 0,247	2379	0,939 ± 0,204	0,858 ± 0,098
2286	0,878 ± 0,078	1,291 ± 0,367	2380	1,722 ± 0,101	1,128 ± 0,285
2287	0,751 ± 0,011	0,871 ± 0,102	2381	1,063 ± 0,191	0,756 ± 0,109
2288	0,932 ± 0,118	0,943 ± 0,029	2382	1,151 ± 0,365	1,070 ± 0,064

2289	1,039 ± 0,146	0,992 ± 0,153	2383	1,060 ± 0,292	0,833 ± 0,082
2290	0,353 ± 0,036	0,698 ± 0,155	2384	0,439 ± 0,101	0,533 ± 0,067
2291	0,434 ± 0,046	0,911 ± 0,092	2385	0,515 ± 0,089	0,701 ± 0,178
2292	0,832 ± 0,000	1,135 ± 0,048	2386	0,274 ± 0,087	0,603 ± 0,032
2293	0,925 ± 0,126	1,010 ± 0,045	2387	0,201 ± 0,063	0,436 ± 0,028
2294	0,546 ± 0,033	0,743 ± 0,100	2388	0,436 ± 0,021	0,901 ± 0,318
2295	0,863 ± 0,122	1,047 ± 0,184	2389	0,820 ± 0,184	1,085 ± 0,307
2296	0,213 ± 0,028	0,411 ± 0,079	2390	0,568 ± 0,108	0,772 ± 0,175
2297	0,643 ± 0,028	0,704 ± 0,083	2391	0,129 ± 0,015	0,273 ± 0,006
2298	0,695 ± 0,037	0,729 ± 0,092	2392	0,283 ± 0,052	0,636 ± 0,039
2299	0,827 ± 0,067	0,907 ± 0,171	2393	1,049 ± 0,089	0,862 ± 0,388
2300	0,786 ± 0,181	1,090 ± 0,106	2394	0,254 ± 0,026	0,533 ± 0,076
2301	0,423 ± 0,102	0,558 ± 0,034	2395	0,218 ± 0,029	0,494 ± 0,104
2302	0,147 ± 0,028	0,414 ± 0,019	2396	0,939 ± 0,299	1,321 ± 0,070
2303	0,294 ± 0,034	0,414 ± 0,002	2397	0,119 ± 0,024	0,254 ± 0,048
2304	0,302 ± 0,025	0,528 ± 0,116	2398	0,534 ± 0,043	1,047 ± 0,047
2305	0,992 ± 0,217	0,961 ± 0,120	2399	0,418 ± 0,081	0,784 ± 0,071
2306	0,613 ± 0,031	0,596 ± 0,038	2400	0,165 ± 0,020	0,478 ± 0,028
2307	0,702 ± 0,142	0,800 ± 0,248	2401	0,174 ± 0,003	0,375 ± 0,062
2308	0,998 ± 0,059	0,799 ± 0,084	2402	0,128 ± 0,015	0,389 ± 0,060
2309	1,081 ± 0,135	0,823 ± 0,096	2403	0,568 ± 0,106	0,930 ± 0,132
2310	0,923 ± 0,101	0,785 ± 0,122	2404	0,104 ± 0,019	0,234 ± 0,045
2311	0,841 ± 0,130	0,888 ± 0,051	2405	0,138 ± 0,035	0,261 ± 0,044
2312	0,725 ± 0,173	0,899 ± 0,124	2406	0,168 ± 0,044	0,241 ± 0,022
2313	0,886 ± 0,243	0,853 ± 0,133	2407	0,124 ± 0,021	0,222 ± 0,027
2314	0,920 ± 0,150	0,692 ± 0,141	2408	0,282 ± 0,004	0,730 ± 0,045
2315	0,876 ± 0,099	0,781 ± 0,206	2409	0,104 ± 0,020	0,301 ± 0,085
2316	0,579 ± 0,055	0,797 ± 0,211	2410	0,154 ± 0,022	0,228 ± 0,033
2317	0,843 ± 0,157	0,842 ± 0,239	2411	0,410 ± 0,083	0,796 ± 0,110
2318	0,780 ± 0,103	0,885 ± 0,370	2412	0,291 ± 0,014	0,515 ± 0,037
2319	0,234 ± 0,055	0,454 ± 0,101	2413	0,317 ± 0,055	0,675 ± 0,104
2320	0,486 ± 0,059	0,770 ± 0,312	2414	0,167 ± 0,038	0,422 ± 0,070
2321	0,665 ± 0,033	0,561 ± 0,043	2415	0,119 ± 0,015	0,180 ± 0,097
2322	0,306 ± 0,059	0,468 ± 0,012	2416	0,166 ± 0,031	0,247 ± 0,031
2323	0,664 ± 0,166	0,631 ± 0,085	2417	0,253 ± 0,037	0,295 ± 0,057
2324	1,046 ± 0,208	1,081 ± 0,293			

Пример 11. Определение EC₅₀ РНК-триггера Hif2α.

Восемь наилучших канонических последовательностей дополнительно оценивали путем определения концентрации EC₅₀. Каждый триггер оценивали в отношении нокдауна в одинаковых условиях и анализах, как описано выше, но при 10 различных концентрациях, варьирующих от 0,00051 до 10 нМ. EC₅₀ определяли с применением программного обеспечения GraphPad Prism. Каждую из первых пяти канонических последовательностей модифицировали, чтобы данные последовательности содержали UNA в сайтах 6 и 7. Данные триггеры вместе с родительскими каноническими последовательностями оценивали одновременно для определения концентрации EC₅₀ с применением тех же условий и анализов, как описано выше; табл. 6.

Таблица 6
Значения EC₅₀ (нМ), определенные in vitro для указанных РНК-триггеров

EC ₅₀		EC ₅₀ UNA		
Идентиф. номер	EC ₅₀ (нМ)	Идентиф. номер	Мод.	EC ₅₀
XD-02335	0,0593	AD00988	UNA6	0,8406
		AD00993	UNA7	0,5504
XD-02337	0,1010			
XD-02371	0,0592	AD00989	UNA6	0,3754
		AD00994	UNA7	0,08068
XD-02391	0,1554			
XD-02397	0,0858			
XD-02404	0,0570	AD00990	UNA6	0,1534
		AD00995	UNA7	0,1689
XD-02407	0,0287	AD00991	UNA6	0,3503
		AD00996	UNA7	0,1176
XD-02415	0,0892	AD00992	UNA6	0,1419
		AD00997	UNA7	0,1827

Пример 12. Получение клеток светлоклеточной почечно-клеточной карциномы A498 (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC), экспрессирующих SEAP.

Вектор экспрессии pCR3.1, экспрессирующий репортерный ген секретлируемой щелочной фосфатазы (secreted alkaline phosphatase, SEAP) под промотором CMV, получали путем прямого клонирования кодирующей последовательности SEAP, амплифицированной методом ПЦР с вектора Clontech's

pSEAP2-basic. В праймеры, используемые для амплификации кодирующей последовательности SEAP, добавляли удобные сайты рестрикции для клонирования в вектор pCR3.1 (Invitrogen). Полученную в результате конструкцию pCR3-SEAP использовали для получения линии клеток ccRCC A498, экспрессирующей SEAP. Вкратце клетки ccRCC A498 трансфицировали плазмидой pCR3-SEAP путем электропорации согласно рекомендациям производителя. Проводили селекцию стабильных трансфектантов на основании устойчивости к G418. Выбранные клоны A498-SEAP оценивали в отношении экспрессии SEAP и стабильности интеграции.

Пример 13. Мыши, несущие ортотопическую опухоль RCC, с клетками A498, стабильно экспрессирующими SEAP.

Самкам голых бестимусных мышей проводили анестезию ~3% изофлураном и помещали в положение лежа на правом боку. Делали небольшие размером 0,5-1 см продольные разрезы брюшной стенки на левом боку. Левую почку извлекали из брюшины с применением влажного ватного тампона и аккуратно стабилизировали. Перед самой инъекцией шприц объемом 1,0 мл наполняли смесью клеток/матригеля и к кончику шприца присоединяли катетер с иглой 27 калибра. Затем наполненный шприц присоединяли к шприцевой помпе (Harvard Apparatus, модель PHD2000) и удаляли воздух. Наконечник катетера с иглой 27 калибра, присоединенного к шприцу, вводили непосредственно под почечную капсулу возле каудального полюса, а затем наконечник иглы аккуратно продвигали в краниальном направлении вдоль капсулы на 3-4 мм. В паренхиму почки медленно инъецировали аликвоту объемом 10 мкл смеси в соотношении 2:1 (об.:об.) клеток/матригеля, содержащую приблизительно 300000 клеток, с применением шприцевого насоса. Иглу оставляли в почке в течение 15-20 с, чтобы убедиться, что инъекция была завершена. Затем удаляли иглу из почки и ватный тампон помещали на участок инъекции на 30 с для предотвращения утечки клеток или кровотечения. Затем почку аккуратно помещали в брюшину и стенку брюшной полости закрывали. Сыворотку собирали каждые 7-14 дней после имплантации для контроля роста опухоли с применением коммерческого набора для анализа SEAP. В большинстве исследований мышей с опухолью использовали через 5-6 недель после имплантации, когда размеры опухоли составляли, как правило, приблизительно 4-8 мм.

Пример 14. Оценка РНК-триггеров Hif2 α на мышах, несущих ортотопическую опухоль RCC.

Конъюгаты РНК-триггера Hif2 α для доставки, нацеленные на RGD. Полимеры для доставки модифицировали с применением RGD-PEG-HyNic, RGD-PEG-ACit-PNP или RDG-PEG-FCitFP-TFP и модифицирующего агента PEG-дипептид. Указанное количество полимера 126 или полимера 100 модифицировали с помощью 8 \times PEG₁₂-ACit-PABC-PNP/0,5 \times альдегид-PEG24-FCit-PABC-PNP (с миметиком RGD № 1-PEG-HyNic с применением протокола № 1) и указанного количества указанного РНК-триггера Hif2 α . Полимер 064 модифицировали согласно протоколу 7. Мышей, несущих опухоль RCC почки, получали, как описано, и проводили лечение одной инъекцией в хвостовую вену изотонической глюкозы (Г1) или конъюгата указанного РНК-триггера Hif2 α с полимером для доставки. Проводили эвтаназию мышей в указанное время после инъекции и суммарную РНК получали из опухоли почки с применением реактива Trizol согласно рекомендациям производителя. Относительные уровни мРНК Hif2 α определяли методом ОТ-кПЦР (количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией), как описано ниже, и сравнивали с мышами, получавшими лечение исключительно буфером для доставки (изотонической глюкозой).

Таблица 7

Нокдаун Hif2 α у мышей после доставки РНКи-триггера Hif2 α

РНКи-триггер		Полимер		Относительная экспрессия	
Номер дуплекса	мкг	Номер	мкг	День 4	Низкая вероятность ошибок/ Высокая вероятность ошибок
Изотоническая глюкоза	0		0	1,00	0,06/0,06
AD01031	80	126	400	0,20	0,04/0,05
AD01214	80	126	400	0,29	0,08/0,12
AD01214	112,5	006	300	0,36	0,07/0,09
AD01255	80	126	400	0,28	0,05/0,05
AD01476	115	100A	375	0,32	0,04/0,04
AD01291	80	126	400	0,19	0,03/0,03
AD01292	80	126	400	0,27	0,06/0,08
AD01293	80	126	400	0,20	0,01/0,01
AD01294	80	126	400	0,17	0,01/0,02
AD01295	80	126	400	0,22	0,02/0,02
AD01296	80	126	400	0,21	0,04/0,06
AD01029	80	126	400	0,94	0,08/0,09
AD01030	80	126	400	0,47	0,08/0,10
AD01256	80	126	400	0,22	0,05/0,07
AD01257	80	126	400	0,24	0,04/0,05
AD01258	80	126	400	0,38	0,03/0,03
AD01424	150	100A	300	0,54	0,06/0,07
AD01404	150	100A	300	0,58	0,11/0,13
AD01405	150	100A	300	0,51	0,10/0,12
AD01406	150	100A	300	0,45	0,06/0,07
AD01407	150	100A	300	0,47	0,06/0,07
AD01408	150	100A	300	0,50	0,07/0,09
AD01409	150	100A	300	0,55	0,03/0,03
AD01410	150	100A	300	0,41	0,10/0,12
AD01411	150	100A	300	0,36	0,01/0,01
AD01288	115	100A	375	0,32	0,02/0,02
AD01522	115	100A	375	0,44	0,07/0,09
AD01289	115	100A	375	0,28	0,06/0,08
AD01290	115	100A	375	0,39	0,02/0,02
AD01523	115	100A	375	0,49	0,04/0,05
AD01524	115	100A	375	0,26	0,05/0,07
AD01554	115	100A	375	0,29	0,04/0,04

041697

AD01555	115	100A	375	0,20	0,03/0,03
AD01025	80	126	400	0,34	0,02/0,02
AD01023	80	126	400	0,93	0,10/0,12
AD01024	80	126	400	0,51	0,04/0,05
AD01028	80	126	400	0,39	0,04/0,04
AD01026	80	126	400	0,97	0,12/0,13
AD01027	80	126	400	0,92	0,08/0,09
AD01034	80	126	400	0,35	0,07/0,09
AD01032	80	126	400	1,00	0,09/0,10
AD01033	80	126	400	1,08	0,08/0,09
AD01022	80	126	400	0,53	0,07/0,09
AD01020	80	126	400	0,94	0,06/0,06
AD01021	80	126	400	0,90	0,05/0,05
AD01654	100	100A	250	0,185	0,01/0,01
AD01655	100	100A	250	0,234	0,02/0,02
AD01656	100	100A	250	0,184	0,01/0,01
AD01657	100	100A	250	0,256	0,03/0,03
AD01658	100	100A	250	0,138	0,01/0,01
AD01659	100	100A	250	0,249	0,04/0,05
AD01884	100	064	250	0,091	0,01/0,01
AD01885	100	064	250	0,146	0,02/0,02
AD01886	100	064	250	0,292	0,04/0,05
AD01887	100	064	250	0,329	0,05/0,06
AD01888	100	064	250	0,209	0,04/0,08
AD01889	100	064	250	0,282	0,04/0,05
AD01890	100	064	250	0,256	0,02/0,03
AD01891	100	064	250	0,189	0,02/0,03
AD01892	100	064	250	0,146	0,03/0,03
AD01893	100	064	250	0,115	0,02/0,03
AD02691	75	064	187,5	0,124	0,04/0,07
AD02692	75	064	187,5	0,089	0,03/0,04
AD02693	75	064	187,5	0,122	0,01/0,01
AD02694	75	064	187,5	0,099	0,01/0,01
AD02695	75	064	187,5	0,101	0,02/0,02
AD02733	75	064	187,5	0,283	0,02/0,03
AD02734	75	064	187,5	0,262	0,03/0,03
AD02735	75	064	187,5	0,080	0,01/0,02
AD01884	75	064	187,5	0,227	0,02/0,02
AD01884	50	064	125	0,203	0,03/0,03
AD02692	75	064	187,5	0,121	0,02/0,02
AD02692	50	064	125	0,092	0,01/0,01
AD02695	75	064	187,5	0,155	0,02/0,02
AD02695	50	064	125	0,123	0,03/0,03

AD02735	75	064	187,5	0,222	0,07/0,10
AD02735	50	064	125	0,144	0,03/0,03
AD02857	50	064	125	0,192	0,03/0,03
AD02858	50	064	125	0,192	0,04/0,05
AD02859	50	064	125	0,214	0,03/0,03
AD02860	50	064	125	0,165	0,02/0,02
AD02949	50	064	125	0,176	0,05/0,07
AD02074	50	064	125	0,566	0,01/0,13
AD02861	50	064	125	0,103	0,03/0,05
AD02862	50	064	125	0,093	0,05/0,11
AD02873	50	064	125	0,079	0,04/0,06
AD02875	50	064	125	0,101	0,01/0,02
AD03011	50	064	125	0,183	0,01/0,02
AD02874	50	064	125	0,138	0,05/0,07
AD03187	50	064	125	1,000	0,06/0,07
AD03188	50	064	125	0,308	0,08/0,07
AD03189	50	064	125	0,245	0,02/0,02
AD03190	50	064	125	0,269	0,08/0,12
AD03191	50	064	125	0,307	0,13/0,24
AD03192	50	064	125	0,286	0,01/0,01
AD03193	50	064	125	0,275	0,07/0,09
AD03125	50	064	125	0,205	0,04/0,05
AD03126	50	064	125	0,172	0,04/0,04
AD03253	50	064	125	0,188	0,04/0,05
AD03264	50	064	125	0,264	0,09/0,13
AD03265	50	064	125	0,294	0,07/0,08
AD03266	50	064	125	0,408	0,07/0,08
AD03254	50	064	125	0,295	0,06/0,07
AD03255	50	064	125	0,264	0,07/0,10
AD03256	50	064	125	0,333	0,06/0,08
AD03257	50	064	125	0,203	0,04/0,05
AD03258	50	064	125	0,137	0,02/0,02
AD03259	50	064	125	0,179	0,03/0,04
AD03260	50	064	125	0,175	0,03/0,04
AD03261	50	064	125	0,177	0,02/0,02
AD03262	50	064	125	0,197	0,01/0,01
AD03263	50	064	125	0,134	0,04/0,06

РНКи-триггеры конъюгировали с указанным обратимо модифицированным полимером для доставки.

Анализ методом количественной ПЦР в режиме реального времени. При подготовке количественной ПЦР суммарную РНК выделяли из образцов ткани, гомогенизированных в TriReagent (Molecular Research Center, Цинциннати, Огайо) согласно протоколу производителя. Проводили обратную транскрипцию приблизительно 500 нг РНК с применением набора High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). В случае экспрессии Hif2 α (EPAS1) человека (опухоли) использовали предварительно выполненные анализы экспрессии генов TaqMan для Hif2 α человека (каталожный № 4331182) и CysA (PPIA) каталожный № 4326316E) в биплексных реакциях в трех повторах с применением мастер-микс TaqMan Gene Expression (Life Technologies) или мастер-микс VeriQuest Probe (Affymetrix). В случае экспрессии VegFa (VEGFA) человека (опухоли) использовали предварительно выполненные анализы экспрессии генов TaqMan для VegFa человека (каталожный № 4331182, идентиф. № анализа Hs00900055) и CysA (каталожный № 4326316E) в биплексных реакциях в трех повторах с применением мастер-микс TaqMan Gene Expression (Life Technologies) или мастер-микс VeriQuest Probe (Affymetrix). Количественную ПНР проводили с применением системы ПНР в режиме реального времени 7500 Fast или StepOne-Plus (Life Technologies). Для расчета относительной экспрессии генов использовали способ $\Delta\Delta C_T$.

Пример 15. Многодозовый конъюгат РНК-триггера Hif2 α с полимером для доставки ингибирует рост опухоли на мышах, несущих ортотопическую опухоль RCC.

Конъюгат РНК-триггера Hif2 α с полимером для доставки получали с применением протокола № 1 с идентиф. номером дуплекса РНК-триггера AD01031 и полимером Ant 126. Затем конъюгат очищали методом TFF и концентрацию полимера, РНК-триггера, RGD и эффективность модифицирующей

конъюгации определяли, как описано выше. Еженедельные дозы конъюгата РНКи-триггера Hif2 α с полимером для доставки, содержащие 400 мкг (масса полимера) или 280 мкг (масса полимера), вводили внутривенным способом 2 различным группам мышей, несущих опухоль. Мышей, несущих опухоль, получавших изотоническую глюкозу (ИГ), использовали в качестве контроля. В течение исследования вводили всего 3 еженедельные дозы. Скорости роста опухоли оценивали на основании уровня SEAP в сыворотке, отобранной с интервалами в 5-7 дней в течение лечения. Массу и объем опухоли определяли при вскрытии. Оценивали макроскопическую морфологию опухоли и гистопатологию ГиЭ.

Таблица 8

Осуществление нокдауна Hif2 α и VEGFa конъюгатом РНКи-триггера Hif2 α с полимером для доставки

Лечение	Экспрессия Hif2 α		Экспрессия VEGFa	
	Относительная	Низкая/	Относительная	Низкая/
	экспрессия	высокая вероятность ошибок	экспрессия	высокая вероятность ошибок
Г1 – ИГ	1,00	0,07/0,07	1,00	0,07/0,08
Г2 – 400 мкг	0,18	0,03/0,04	0,45	0,07/0,09
Г3 – 280 мкг	0,19	0,04/0,05	0,39	0,10/0,13

Экспрессия Hif2 α в группе, получавшей 400 мкг или 280 мкг конъюгата РНКи-триггера Hif2 α с полимером для доставки, снижалась на 82 и 81% соответственно по сравнению с контрольной группой (табл. 8). Экспрессия VEGFa, хорошо охарактеризованного нижестоящего гена, регулируемого Hif2 α , также снижалась на 55 и 61% соответственно (табл. 8).

В совокупности после 3 еженедельных инъекций конъюгата РНКи-триггера Hif2 α с полимером для доставки рост опухоли был значительно ингибирован при оценке обеих исследуемых доз. Это подтверждается общими размерами опухоли и уровнями SEAP в сыворотке (фиг. 8, 9 и 12, табл. 9). Тенденция к понижению уровней SEAP после третьих инъекций свидетельствует о начале регрессии опухоли. Помимо этого, исследование гистопатологии опухоли на окрашенных ГиЭ зафиксированных в формалине и залитых парафином срезов продемонстрировало разрушение типичной трубчатой структуры RCC. Количество апоптотических клеток являлось увеличенным в группах лечения. Некоторые образцы опухоли содержали большие площади некроза опухоли (фиг. 10).

Таблица 9

Уровни SEAP в сыворотке в течение лечения, Г1 и Г2, n=4; Г3, n=3

Лечение	SEAP (кратность изменения относительно дня -1)			
	День -1	День 7	День 14	День 21
Г1 – ИГ	1,00 \pm 0,19	1,65 \pm 0,22	3,44 \pm 0,23	7,48 \pm 0,27
Г2 – 400 мкг	1,00 \pm 0,45	0,79 \pm 0,43	1,36 \pm 0,61	1,25 \pm 0,68
Г3 – 280 мкг	1,00 \pm 0,14	1,46 \pm 0,09	2,55 \pm 0,29	1,82 \pm 0,35

Пример 16. Оценка РНКи-триггеров Hif2 α на мышах, несущих ортотопическую опухоль RCC.

Конъюгаты нацеленного на RGD РНКи-триггера Hif2 α с полимером для доставки получали с применением полимеров 126, 100A или 006. РНКи-триггер, мкг указывает на количество триггера, вступившего в реакцию с полимером. Полимер модифицировали указанным миметиком RGD и модифицирующим агентом на основе PEG, как описано выше. Мышей, несущих опухоль RCC почки, получали, как описано, и проводили лечение одной инъекцией в хвостовую вену изотонической глюкозы (Г1) или указанного конъюгата РНКи-триггера Hif2 α с полимером для доставки. Проводили эвтаназию мышей через 72 ч (день 4) после инъекции и суммарную РНК получали из опухоли почек с применением реактива Trizol согласно рекомендациям производителя. Относительные уровни мРНК Hif2 α определяли методом ОТ-кПЦР, как описано ниже, и сравнивали с мышами, получавшими лечение исключительно буфером для доставки (изотонической глюкозой) (табл. 11).

Пример 17. Исследование комбинации РНКи-триггера Hif2 α /второго терапевтического средства.

Конъюгат РНКи-триггера Hif2 α с полимером для доставки (125 мкг полимера) получали с применением протокола 7, идентиф. № дуплекса AD1884 и полимера 064. Конъюгат РНКи-триггера Hif2 α с полимером для доставки вводили каждые 4 недели путем внутривенной инъекции, всего 4 дозы. Сунитиниб (малатную соль), полученный в компании LC laboratories, суспендировали в растворе Ora-plus/Ora sweet (50:50, об.:об.). Лечение сунитинибом начинали через 2 недели после введения первой дозы РНКи-триггера Hif2 α . Мышам вводили дозы через желудочный зонд 5 дней/неделю в течение 2 недель, затем не проводили введения в течение 2 недель; в сумме применяли 3 цикла.

Скорости роста опухоли оценивали на основании уровня SEAP в сыворотке, отобранной с интервалами 5-7 дней в течение лечения. Массу и объем опухоли определяли при вскрытии. Оценивали макроскопическую морфологию опухоли и гистопатологию ГиЭ. Относительные уровни экспрессии Hif2 α

являлись на 11,4, 73,8 и 77,6% уменьшенными в группах, получавших лечение сунитинибом в монотерапии, DPC+сунитинибом и DPC в монотерапии соответственно (табл. 10А). Объединенные варианты лечения РНКи-триггером Hif2 α и сунитинибом привели к увеличению ответа, направленного на ингибирование роста опухоли. Общие размеры опухолей были меньше и наблюдался более медленный рост опухоли (который измеряли на основании общей кратности увеличения SEAP) (табл. 10В).

Таблица 10А

Экспрессия Hif2 α в опухолях RCC на моделях на животных, получавших лечение сунитинибом, РНКи-триггером Hif2 α или РНКи-триггером Hif2 α +сунитинибом

Лечение	Экспрессия Hif2 α		
	Относительная экспрессия	Низкая вероятность ошибок	Высокая вероятность ошибок
Изотоническая глюкоза	1,000	0,153	0,180
Сунитиниб	0,886	0,070	0,076
РНКи-триггер Hif2 α	0,262	0,071	0,097
РНКи-триггер Hif2 α + сунитиниб	0,224	0,081	0,126

Таблица 10В

Размер опухоли и экспрессия SEAP в опухолях RCC на моделях на животных, получавших лечение сунитинибом, РНКи-триггером Hif2 α или РНКи-триггером Hif2 α +сунитинибом

Лечение	Масса опухоли (мг)	Объем опухоли (мм ³)	Кратность увеличения SEAP
Изотоническая глюкоза	4158,5 \pm 865	3576,3 \pm 279	21,8 \pm 11
Сунитиниб	2385,7 \pm 845	2113,5 \pm 368	18,1 \pm 9,8
РНКи-триггер Hif2 α	2130,9 \pm 1066	1537,4 \pm 999	20,54 \pm 20
РНКи-триггер Hif2 α + сунитиниб	1075,8 \pm 600	1008,8 \pm 650	5,7 \pm 3,3

Другие варианты реализации настоящего изобретения. Следует понимать, что несмотря на то что настоящее изобретение было описано в сочетании с его подробным описанием, вышеизложенное описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема настоящего изобретения, который определен объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в пределах объема следующей формулы изобретения.

Таблица 11

Экспрессия Hif2 α в клетках RCC мышей, несущих опухоль RCC, после доставки РНКи-триггера Hif2 α

РНКи-триггер Hif2 α		Полимер			RGD			PEG		Относительная экспрессия		
Идентиф. номер дуплекса	мкг	Идентиф. номер	мкг	Очистка	Модифицирующий агент	Кол-во	Число	Модифицирующий агент	День 4	Низкая вероятность ошибок	Высокая вероятность ошибок	
Изотоническая глюкоза									1,000	0,060	0,064	
AD01031	80	126	280		RGD-PEG ₈ -HyNic	0,5 \times		PEG ₁₇ -ACit-PABC-PNP	0,300	0,074	0,098	
AD01031	80	126	280		RGD-PEG ₈ -ACit-PABC-PNP	0,4 \times		PEG ₆ -ACit-PABC-PNP	0,311	0,055	0,067	
AD01214	80	126	280	TFF	RGD-PEG ₈ -HyNic	0,5 \times		PEG ₁₂ -FCit-PABC-PNP	0,489	0,022	0,023	
AD01214	80	126	280		RGD-PEG ₈ -HyNic	0,5 \times		PEG ₁₂ -FCitFP-TFP	0,210	0,032	0,038	
AD01214	80	126	280		RGD-PEG ₈ -ACit-PABC-PNP	0,4 \times		PEG ₆ -ACit-PABC-PNP	0,360	0,019	0,021	
AD01214	80	126	280		RGD-PEG ₈ -ACitFP-NHS	1 \times		PEG ₆ -ACit-PABC-PNP	0,288	0,005	0,005	
AD01214	115	100A	375		RGD-PEG ₈ -HyNic	0,5 \times		PEG ₁₂ -FCitFP-TFP	0,258	0,033	0,038	
AD01214	112,5	100A	375	TFF	RGD-PEG ₁₅ -FCitFP-TFP	0,5 \times	10,8	PEG ₁₂ -ACit-PABC-PNP	0,193	0,046	0,061	
AD01214	112,5	100A	375	TFF	RGD-PEG ₁₅ -FCitFP-TFP	1 \times	16,1	PEG ₁₂ -ACit-PABC-PNP	0,182	0,007	0,008	
AD01214	112,5	100A	375	TFF	RGD-PEG ₁₅ -FCitFP-TFP	2 \times	29,0	PEG ₁₂ -ACit-PABC-PNP	0,182	0,031	0,038	
AD01214	112,5	100A	375	TFF	RGD-PEG ₁₉ -FCitFP-TFP	0,5 \times	10,7	PEG ₁₂ -ACit-PABC-PNP	0,163	0,023	0,027	
AD01214	112,5	100A	375	TFF	RGD-PEG ₁₉ -FCitFP-TFP	1 \times	18,5	PEG ₁₂ -ACit-PABC-PNP	0,114	0,011	0,012	
AD01214	112,5	100A	375	TFF	RGD-PEG ₁₉ -FCitFP-TFP	2 \times	31,1	PEG ₁₂ -ACit-PABC-PNP	0,182	0,047	0,063	
AD01214	112,5	100A	375		RGD-PEG ₁₉ -FCitFP-TFP	1 \times		PEG ₁₂ -FCitFP-TFP	0,148	0,079	0,169	
AD01214	112,5	100A	375		RGD-PEG ₁₉ -FCitFP-TFP	1 \times		PEG ₁₂ -FCitFP-TFP	0,188	0,026	0,03	
AD01214	112,5	100A	375		RGD-PEG ₁₉ -FCitFP-TFP	1 \times		PEG ₁₂ -ACit-PABC-PNP	0,195	0,043	0,055	
AD01214	112,5	006	300		RGD-PEG ₈ -HyNic			PEG ₁₂ -ACit-PABC-PNP	0,357	0,069	0,086	
AD01214	112,5	100A	375	TFF	RGD-PEG ₂₀ -FCitFP-TFP	0,125 \times	1,9	PEG ₁₂ -ACit-PABC-PNP	0,169	0,052	0,075	
AD01214	112,5	100A	375	TFF	RGD-PEG ₂₀ -FCitFP-TFP	0,25 \times	3,4	PEG ₁₂ -ACit-PABC-PNP	0,168	0,029	0,035	
AD01214	112,5	100A	375	TFF	RGD-PEG ₂₀ -FCitFP-TFP	0,5 \times	6,6	PEG ₁₂ -ACit-PABC-PNP	0,130	0,004	0,005	
AD01214	112,5	100A	375	TFF	RGD-PEG ₂₀ -FCitFP-TFP	1 \times	12,7	PEG ₁₂ -ACit-PABC-PNP	0,121	0,016	0,018	
AD01214	112,5	100A	375	TFF	RGD-PEG ₂₀ -FCitFP-TFP	1,5 \times	20,3	PEG ₁₂ -ACit-PABC-PNP	0,135	0,018	0,020	

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая триггер РНК-интерференции (РНКи-триггер), для ингибирования экспрессии гена Hif2 α , причем указанный РНКи-триггер содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность из нуклеотидов 2-19 последовательности SEQ ID NO: 4 (UUCAUGAAUCGUACGU), причем каждая из смысловой цепи и антисмысловой цепи имеет длину от 20 до 25 нуклеотидов, при этом все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой либо 2'-ОМе - модифицированные нуклеотиды, либо 2'-фтормодифицированные нуклеотиды.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность из нуклеотидов 2-21 последовательности SEQ ID NO: 4 (UUCAUGAAUCGUACGUACGU).

3. Композиция по п.2, отличающаяся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность из нуклеотидов 2-21 из SEQ ID NO: 4 (UUCAUGAAUCGUACGUACGU) и указанная смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность из нуклеотидов SEQ ID NO: 53 (ACGUAACGAUUUCAUGAAU).

4. Композиция по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что указанная смысловая цепь и/или антисмысловая цепь дополнительно содержит 3'- и/или 5'-удлинение, составляющее 1-6 нуклеотидов в длину.

5. Композиция по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что нацеливающая группа конъюгирована с РНКи-триггером.

6. Композиция по п.5, отличающаяся тем, что указанная нацеливающая группа содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из интегринсвязывающего соединения, интегрин $\alpha_v\beta_3$ -связывающего соединения, лиганда RGD, пептида RGD и миметика RGD.

7. Композиция по любому из пп.1-6, отличающаяся тем, что полимер для доставки конъюгирован с РНКи-триггером.

8. Композиция по любому из пп.1-6, отличающаяся тем, что связывающая группа конъюгирована с РНКи-триггером.

9. Композиция по любому из пп.1-8, отличающаяся тем, что указанный РНКи-триггер содержит одну или более фосфотиоатных межнуклеотидных связей.

10. Композиция по любому из пп.1-9, отличающаяся тем, что указанная смысловая цепь содержит одну или две фосфотиоатные межнуклеотидные связи.

11. Композиция по любому из пп.9, 10, отличающаяся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит одну, две, три или четыре фосфотиоатные межнуклеотидные связи.

12. Композиция по любому из пп.1-11, дополнительно содержащая одно или более дополнительных терапевтических средств или средств лечения.

13. Композиция по любому из пп.1-12, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

14. Композиция по любому из пп.1-13, отличающаяся тем, что указанная композиция упакована в набор, контейнер, упаковку, дозатор, преднаполненные шприцы или флаконы.

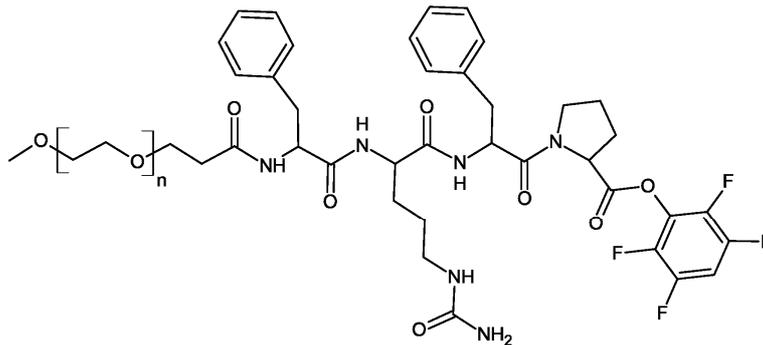
15. Способ ингибирования экспрессии Hif2 α в клетке, ткани или в организме субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп.1-14.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанную композицию вводят парентерально.

17. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанная клетка или ткань представляет собой почечно-клеточную карциному.

18. Применение композиции по любому из пп.1-14 для изготовления лекарственного препарата для лечения почечно-клеточной карциномы.

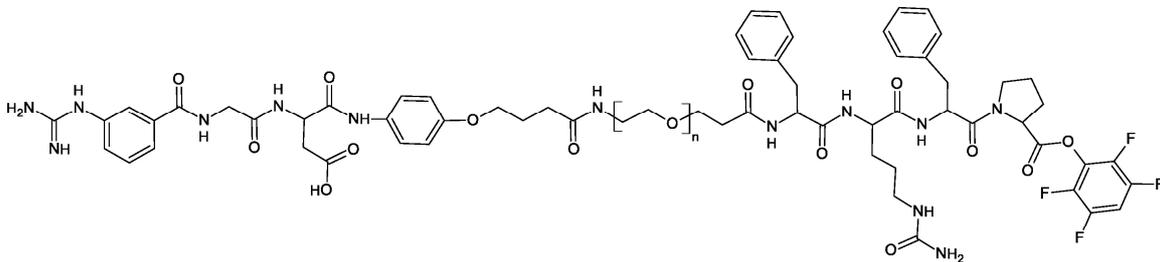
19. Триггер (РНКи), способный ингибировать экспрессию гена Hif2 α , причем указанный РНКи-триггер содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность из нуклеотидов 2-19 последовательности SEQ ID NO: 40 (UUCAUGAAAUCGUUACGU), причем каждая из смысловой цепи и антисмысловой цепи имеет длину от 20 до 25 нуклеотидов, при этом все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой либо 2'-ОМе - модифицированные нуклеотиды, либо 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды.



PEG_n-FCitFP-TFP (n = 1-25)

PEG₁₂-FCitFP-TFP (n = 11)

Фиг. 1



RGD-PEG_n-FCitFP-TFP (n = 1-50)

RGD-PEG₈-FCitFP-TFP (n = 8)

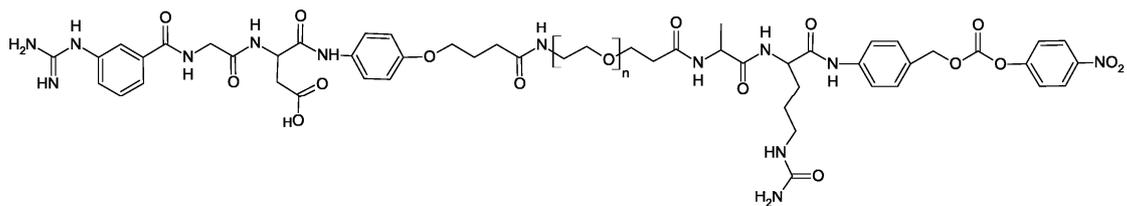
RGD-PEG₁₅-FCitFP-TFP (n = 15)

RGD-PEG₁₆-FCitFP-TFP (n = 16)

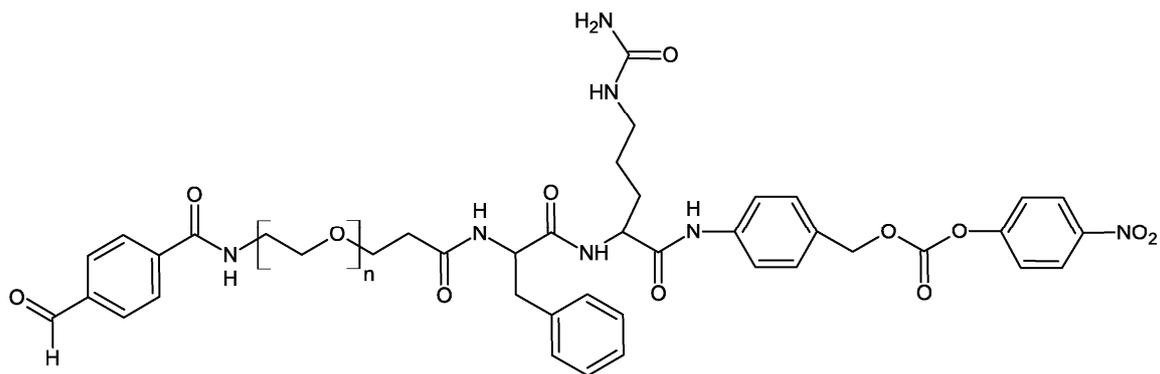
RGD-PEG₁₉-FCitFP-TFP (n = 19)

RGD-PEG₂₀-FCitFP-TFP (n = 20)

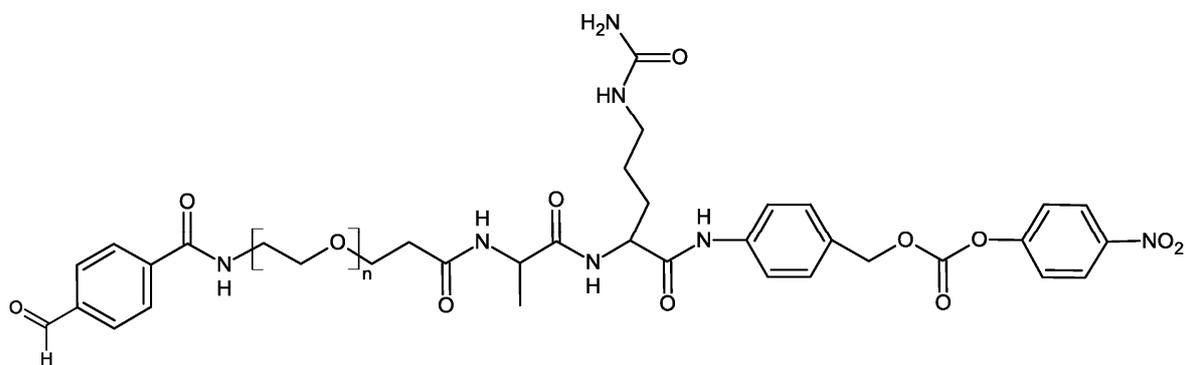
Фиг. 2

RGD-PEG_n-ACit-PABC-PNP (n = 4-30)RGD-PEG₈-ACit-PABC-PNP (n = 8)

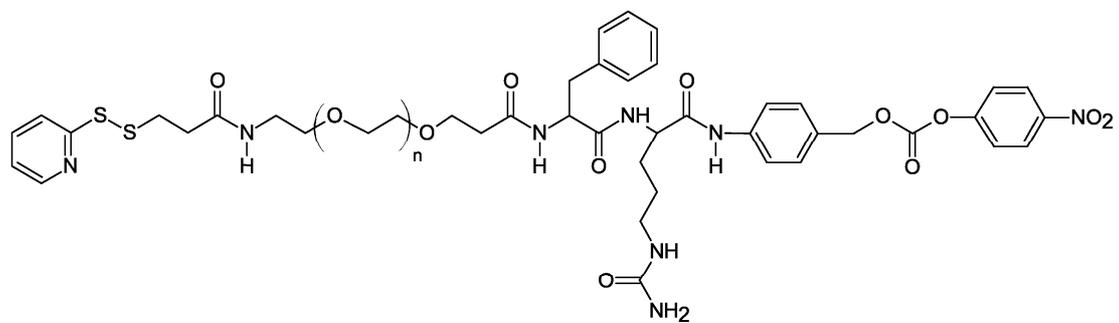
Фиг. 3

альдегид-PEG_n-FCit-PABC-PNP (n = 4-30)альдегид-PEG₁₂-FCit-PABC-PNP (n = 12)

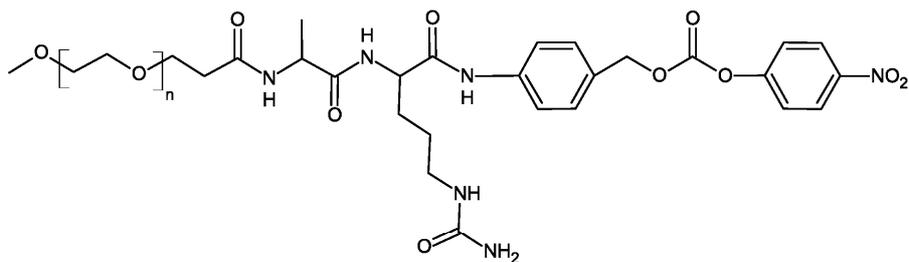
Фиг. 4

альдегид-PEG_n-ACit-PABC-PNP (n = 4-30)альдегид-PEG₆-ACit-PABC-PNP (n = 6)альдегид-PEG₁₂-ACit-PABC-PNP (n = 12)альдегид-PEG₂₄-ACit-PABC-PNP (n = 24)

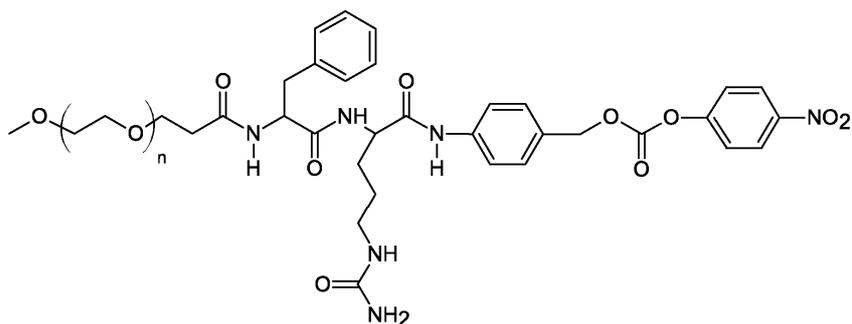
Фиг. 5

SPDP-PEG_n-FCit-PABC-PNP (n = 4-30)SPDP-PEG₂₄-FCit-PABC-PNP (n = 23)

Фиг. 6

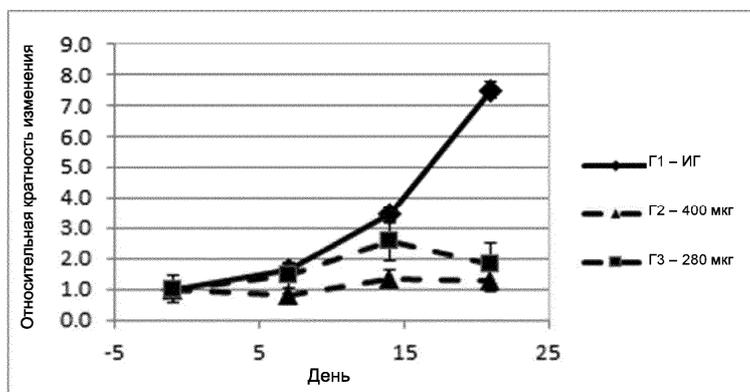


$\text{PEG}_n\text{-ACit-PABC-PNP}$ ($n = 4-30$)
 $\text{PEG}_6\text{-ACit-PABC-PNP}$ ($n = 5$)
 $\text{PEG}_{12}\text{-ACit-PABC-PNP}$ ($n = 11$)
 $\text{PEG}_{24}\text{-ACit-PABC-PNP}$ ($n = 23$)

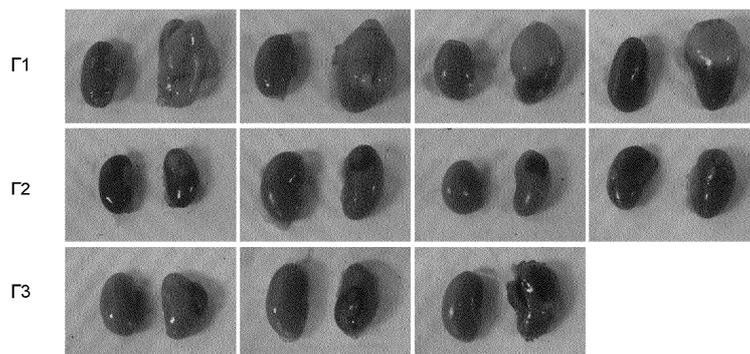


$\text{PEG}_n\text{-FCit-PABC-PNP}$ ($n = 4-30$)
 $\text{PEG}_{12}\text{-FCit-PABC-PNP}$ ($n = 11$)

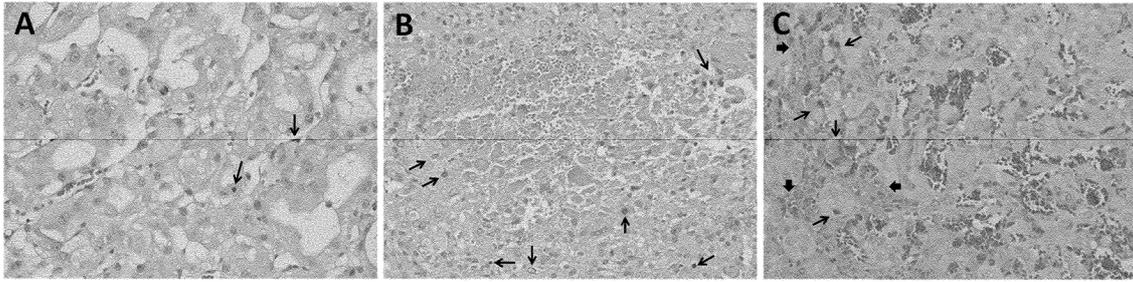
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10