

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202292357** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2022.12.14

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

(22) Дата подачи заявки  
2021.02.12

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ иРНК ДЛЯ АПОЛИПОПРОТЕИНА С3 (АРОС3) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) 62/977,875; 63/144,516

(32) 2020.02.18; 2021.02.02

(33) US

(86) PCT/US2021/017826

(87) WO 2021/167841 2021.08.26

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

(72) Изобретатель:

Тремблэй Фредерик, Бондюрант  
Лукас Д., Макининч Джеймс Д.,  
Касторено Адам, Шлегель Марк К.,  
Каиттанис Чараламбос (US)

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

---

(57) Изобретение относится к агентам РНКи, например агентам двухцепочечной РНК (дцРНК), нацеленным на ген аполипопротеина С3 (АРОС3). Изобретение также относится к способам применения таких агентов РНКи для ингибирования экспрессии гена АРОС3 и к способам профилактики и лечения расстройств, ассоциированных с АРОС3, например гипертриглицеридемии, неалкогольной жировой болезни печени, неалкогольного стеатогепатита, синдрома поликистозных яичников, заболевания почек, ожирения, сахарного диабета 2 типа (инсулинорезистентность), гипертензии, атеросклероза и панкреатита.

---

202292357

A1

A1

202292357

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575450EA/061

### КОМПОЗИЦИИ ИРНК ДЛЯ АПОЛИПОПРОТЕИНА С3 (АРОС3) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

#### Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США No. 63/144516, поданной 2 февраля 2021 г., и предварительной заявке на патент США No. 62/977875, поданной 18 февраля 2020 г. Полное содержание каждой из вышеупомянутых заявок включено в настоящий документ посредством ссылки.

#### Список последовательностей

Настоящая заявка включает список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и настоящим полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 10 февраля 2021 г., имеет название 121301\_10420\_SL.TXT и ее размер составляет 249455 байт.

#### Предпосылки создания изобретения

Аполипопротеин С3 (АРОС3) представляет собой липопротеин очень низкой плотности (ЛПОНП) и важный регулятор метаболизма липопротеинов. У человека АРОС3 кодируется геном АРОС3, который расположен в кластере генов вместе с генами АРОА1 и АРОА4 на длинном плече хромосомы 11. АРОС3 экспрессируется в печени и, в меньшей степени, в кишечнике в виде небольшого белка из 99 аминокислот. После удаления сигнального пептида из 20 аминокислот в эндоплазматическом ретикулуме образуется зрелый белок АроС3 из 79 аминокислот, который может присутствовать в виде негликозилированной или гликозилированной изоформы.

Основная роль АРОС3 заключается в том, что он является регулятором липолиза посредством неконкурентного ингибирования эндотелий-связанной липопротеиновой липазы (LPL). LPL гидролизует триацилглицерины в богатых триацилглицерином (триглицеридами) липопротеинах (TRL), высвобождая жирные кислоты в плазму и превращая большие частицы, богатые триацилглицерином, в малые липопротеины, обедненные триацилглицерином. Индивиды, у которых отсутствует АРОС3, имеют низкие уровни TRL в сочетании с высокоэффективным липолизом триацилглицеринов. Кроме того, было показано, что мышцы, у которых ген АРОС3 был генетически делетирован, имеют низкие уровни триацилглицерина в плазме и эффективный катаболизм TRL. АРОС3 также ингибирует печеночную липазу (HL), липолитический фермент с активностью триацилглицеринлипазы и фосфолипазы А1, который синтезируется в печени. Ингибирующее действие АРОС3 на HL дополнительно снижает липолиз и поглощение остатков TRL печенью. Также было показано, что АРОС3 стимулирует синтез липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП). Считается, что основные механизмы, связанные с этим эффектом АРОС3, могут быть связаны с ингибированием опосредованной протеасомами деградации АРОВ, что приводит к увеличению синтеза и секреции АРОВ, а также к увеличению синтеза триглицеридов ЛПОНП. Таким образом, АРОС3 может играть

ключевую роль в регуляции продукции ЛПОНП печенью.

Клеточные исследования показали, что АРОС3 может препятствовать связыванию TRP и остатка с рецепторами липопротеинов печени. АРОС3 может отменять АРОВО- и АРОЕ-опосредованное связывание липопротеинов с рецептором липопротеинов низкой плотности (LDLR), либо маскируя, либо изменяя конформацию АРОВО и АРОЕ. Связывание хиломикронов и частиц ЛПОНП с рецептором, стимулирующим липолиз (LSR), также значительно ингибируется АРОС3.

Повышение уровня АРОС3 индуцирует развитие гипертриглицеридемии или высоких (гипер-) уровней (-емии) триглицеридов в крови. Повышенные уровни триглицеридов связаны с рядом заболеваний, включая сердечно-сосудистые заболевания, атеросклероз, неалкогольную жировую болезнь печени, неалкогольный стеатогепатит, синдром поликистозных яичников, заболевания почек, ожирение, сахарный диабет 2 типа (инсулинорезистентность), гипертензию и поражения кожи (ксантомы). Очень высокий уровень триглицеридов также увеличивает риск острого панкреатита. Таким образом, регулирование метаболизма АРОС3 является важным терапевтическим подходом к лечению гипертриглицеридемии и связанных с ней заболеваний.

Соответственно, в данной области существует потребность в регуляторах экспрессии АРОС3 для лечения ассоциированных с аполипопротеином С3 расстройств, таких как гипертриглицеридемия.

#### Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям иРНК, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцированным сайленсинг-комплексом (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена, кодирующего аполипопротеин С3 (АРОС3). Аполипопротеин С3 (АРОС3) может находиться внутри клетки, например, в клетке субъекта, такого как субъект-человек.

В одном аспекте изобретение относится к агенту двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке, где агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1 и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2. В одном варианте осуществления агент дцРНК содержит по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию нуклеотида, например, модификацию с удаленным азотистым основанием; несоответствие с противоположным нуклеотидом в дуплексе; и дестабилизирующую модификацию сахара, 2'-дезоксимо-модификацию, ациклический нуклеотид, незапертую нуклеиновую кислоту (UNA), или глицериновую нуклеиновую кислоту (GNA), например, антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию нуклеотида.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке, где указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где антисмысловая цепь содержит область комплементарности мРНК, кодирующей аполипопротеин С3, и, где область комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из таблиц 2-5, 14 и 15.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке, где указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из нуклеотидной последовательности нуклеотидов; 232-254; 233-255; 238-260; 239-261; 242-264; 243-265; 244-266; 264-286; 268-290; 426-448; 431-453; 432-454; 433-455; 435-457; 436-458; 499-521; 500-522; 503-525; 504-526; 507-529; 510-532; или 511-533 нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из нуклеотидной последовательности антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-959917.1; AD-959918.1; AD-960096.1; AD-960064.1; AD-959914.1; AD-959941.1; AD-960031.1; AD-960063.1; AD-960293.1; AD-960288.1; AD-960445.1; AD-960292.1; AD-960475.1; AD-960442.1; AD-960470.1; AD-960436.1; AD-960446.1; AD-960474.1; AD-960294.1; AD-960471.1; AD-960314.1; AD-960443.1; AD-960282.1; AD-960283.1; AD-80794.7; AD-960478.1; AD-960481.1; и AD-960482.1.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке, где дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из нуклеотидной последовательности нуклеотидов 235-257; 238-260; 242-264; 243-265; 244-266; 426-448; 430-450; 431-453; 432-454; 433-455; 435-457; 436-458; 499-521; 503-525; и 504-526 нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из

группы, состоящей из AD-959917.1; AD-960064.1; AD-960031.1; AD-960063.1; AD-960293.1; AD-960288.1; AD-960445.1; AD-960292.1; AD-960475.1; AD-960442.1; AD-960470.1; AD-960436.1; AD-960446.1; AD-960474.1; AD-960294.1; AD-960443.1; AD-80794.7; и AD-959910.1.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке, где дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из нуклеотидной последовательности нуклеотидов 232-254; 239-261; 242-264; 244-266; 258-280; 264-286; 268-290, 429-451; 430-450; 430-452; 433-455; 434-456; 435-457; 500-522; 503-525; 507-529; и 510-532 нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-80794.8; AD-959907.2; AD-959914.2; AD-959916.2; AD-959932.2; AD-960314.2; AD-959941.2; AD-960030.2; AD-960062.2; AD-960064.2; AD-960065.2; AD-960066.2; AD-960294.2; AD-960471.2; AD-960474.2; AD-960478.2; и AD-960481.2.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке, где дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из нуклеотидной последовательности нуклеотидов 429-455 или 504-532 нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке, где дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из нуклеотидной последовательности нуклеотидов 429-451; 430-452; 431-451; 432-452; 433-455; 434-452; 504-526; и 506-526 нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой

из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-960030; AD-960064; AD-1143243; AD-1143245; AD-1143247; AD-1143249; AD-1143256; AD-1143260; AD-1143278; AD-1143287; AD-1143295; AD-1143299; AD-1143302; и AD-1143305.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности антисмысловой цепи дуплекса AD-1143278 или AD-960064.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности нуклеотидов 429-456 SEQ ID NO:1.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности нуклеотидов 433-455 SEQ ID NO:1.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности нуклеотидов 434-452 SEQ ID NO:1.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности антисмысловой цепи дуплекса AD-1143243.

В одном варианте осуществления агент дцРНК содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

В одном варианте осуществления по существу все нуклеотиды смысловой цепи; по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию; или по существу все нуклеотиды смысловой цепи и по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой цепи содержат модификацию; все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию; или все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезокси-нуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно-ограниченного нуклеотида, затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидроксил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего

неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфоротиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата, термодестабилизирующего нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA) и 2-O-(N-метилацетамид)-модифицированного нуклеотида; и их комбинации.

В одном варианте осуществления модификации нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-O-алкила, 2'-O-аллила, 2'-C-аллила, 2'-фтора, 2'-дезокси, 2'-гидроксил и гликоля; и их комбинации.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезокси-нуклеотида, 2'-O-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA), например, Ggn, Cgn, Tgn или Agn, и винил-фосфонатного нуклеотида; и их комбинации.

В другом варианте осуществления, по меньшей мере одна из модификаций нуклеотидов представляет собой термически дестабилизирующую модификацию нуклеотида.

В одном варианте осуществления термически дестабилизирующая модификация нуклеотида выбрана из группы, состоящей из модификации с удаленным азотистым основанием; несоответствия с противоположным нуклеотидом в дуплексе; и дестабилизирующей модификации сахара, 2'-дезоксид-модификации, ациклического нуклеотида, незапертой нуклеиновой кислоты (UNA), и глицериновой нуклеиновой кислоты (GNA).

Длина двухцепочечной области может составлять 19-30 пар нуклеотидов; 19-25 пар нуклеотидов; 19-23 пар нуклеотидов; 23-27 пар нуклеотидов; или 21-23 пар нуклеотидов.

В одном варианте осуществления каждая цепь независимо имеет длину не более 30 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления длина смысловой цепи равна 21 нуклеотиду, а длина антисмысловой цепи равна 23 нуклеотидам.

Область комплементарности может иметь длину по меньшей мере 17 нуклеотидов; от 19 до 23 нуклеотидов; или 19 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступающий конец, по меньшей мере, из 1 нуклеотида. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления агент дцРНК дополнительно содержит лиганд.

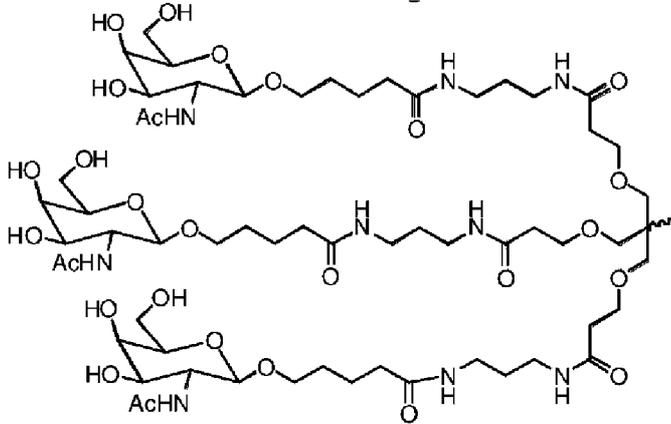
В одном варианте осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи агента дцРНК.

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой производное N-

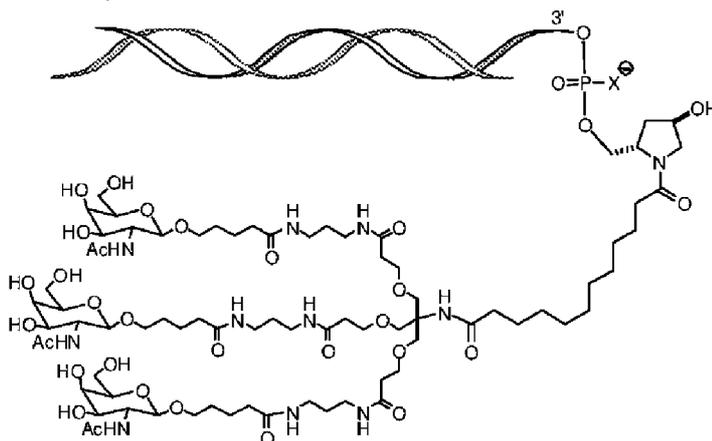
ацетилгалактозамина (GalNAc).

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

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой



В одном варианте осуществления агент дцРНК конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме



и, где X представляет собой O или S.

В одном варианте осуществления X представляет собой O.

В одном варианте осуществления агент дцРНК дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

В одном варианте осуществления фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной цепи, например, антисмысловой цепи или смысловой цепи.

В другом варианте осуществления фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи, например, антисмысловой цепи или смысловой цепи.

В одном варианте осуществления фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-, так и на 3'-конце одной цепи. В одном варианте осуществления цепь представляет собой антисмысловую цепь.

В одном варианте осуществления пара оснований в положении 1 5'-конца

антисмысловой цепи дуплекса представляет собой пару оснований AU.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке, где дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности нуклеотидов 434-452 нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2, где по существу все нуклеотиды смысловой цепи и по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации, 2'-фтор-модификации и дезокси-модификации, где как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь независимо дополнительно содержат по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь, и где по меньшей мере одна цепь конъюгирована с лигандом.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации, 2'-фтор-модификации и 2'-дезокси-модификации.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит 2-6, например, 2, 3, 4, 5 или 6, 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов. В другом варианте осуществления смысловая цепь содержит не более 6, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит не более 2, например, 0, 1 или 2, 2'-дезокси-модифицированных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит не более 4, например, 0, 1, 2, 3 или 4, 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит не более 5, например, 0, 1, 2, 3, 4 или 5, 2'-дезокси-модифицированных нуклеотидов. В другом варианте осуществления антисмысловая цепь содержит 1-5, например, 1, 2, 3, 4 или 5, дезокси-нуклеотидов.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит 4 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, например, нуклеотиды 7 и 9-11, отсчет от 5'-конца, и антисмысловая цепь содержит 2 2'-фтормодифицированных нуклеотида, например, нуклеотиды 14 и 16, отсчет от 5'-конца, и 3 2'-дезокси-модифицированных нуклеотида, например, нуклеотиды 2, 5 и 7, отсчет от 5'-конца.

В одном варианте осуществления фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной цепи, например, антисмысловой цепи или смысловой цепи.

В другом варианте осуществления фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи, например, антисмысловой цепи

или смысловой цепи.

В одном варианте осуществления фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-, так и на 3'-конце одной цепи. В одном варианте осуществления цепь представляет собой антисмысловую цепь.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит две фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи на 5'-конце.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит две фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи на 5'-конце.

В другом варианте осуществления антисмысловая цепь содержит две фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи и на 5'-конце, и на 3'-конце.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит две фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и антисмысловая цепь содержит две фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи и на 5'-конце, и на 3'-конце.

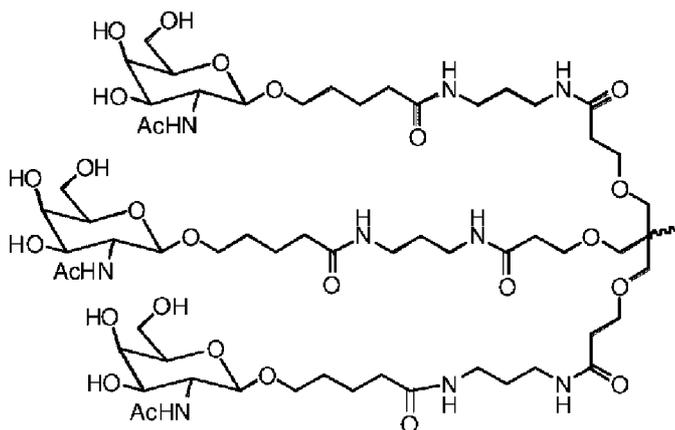
В одном варианте осуществления лиганд конъюгирован со смысловой цепью.

В одном варианте осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи.

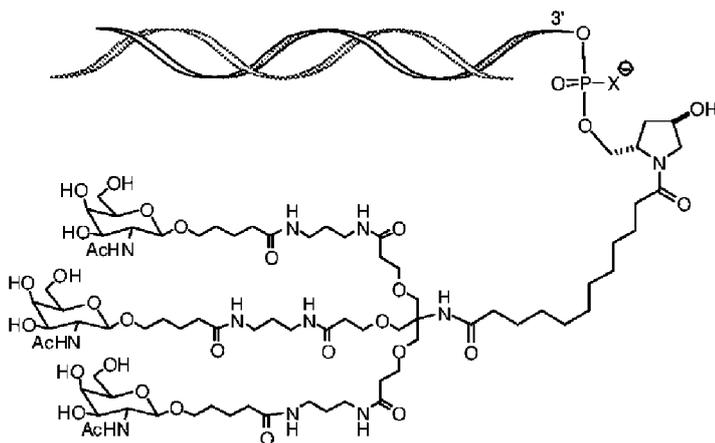
В одном варианте осуществления лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

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

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой



В одном варианте осуществления агент дцРНК конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме



и, где X представляет собой O или S.

В одном варианте осуществления X представляет собой O.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'- CUUAAAAGGGACAGUAUUCUA-3'(SEQ ID NO: 13).

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'- CUUAAAAGGGACAGUAUUCUA-3'(SEQ ID NO: 13).

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- CUUAAAAGGGACAGUAUUCUA-3'(SEQ ID NO: 13).

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'- UAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC-3' (SEQ ID NO: 14).

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'- UAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC-3' (SEQ ID NO: 14).

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 21 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'- UAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC-3'(SEQ ID NO: 14).

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- UAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC-3'(SEQ ID NO: 14).

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- CUUAAAAGGGACAGUAUUCUA-3' (SEQ ID NO:13) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- UAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC-3'(SEQ ID NO: 14).

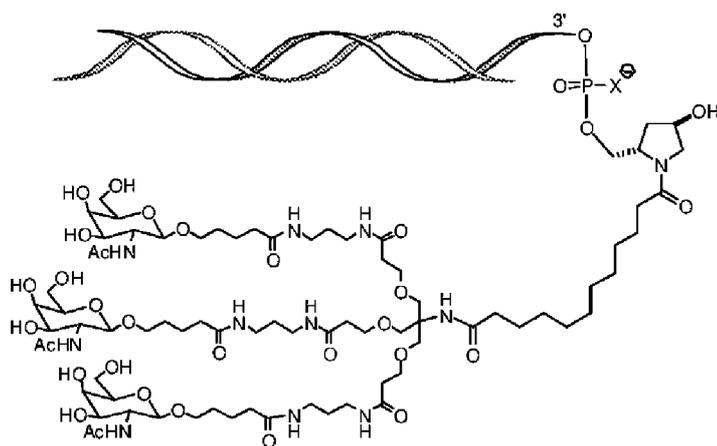
В одном варианте осуществления смысловая цепь отличается не более чем на 3, например, 0, 1, 2 или 3 модифицированных нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'- csusuaaaAfgGfGfAfcagauuucua-3' (SEQ ID NO: 15), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор А, G, С и U, соответственно; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь отличается не более чем на 3, например, 0, 1, 2 или 3 модифицированных нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'- usdAsgadAudAciguCCfuUfuuaagscsc -3' (SEQ ID NO: 16), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор А, G, С и U, соответственно; dA представляет собой 2'-дезоксиаденозин-3'-фосфатный нуклеотид; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- csusuaaaAfgGfGfAfcagauuucua-3' (SEQ ID NO:15) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- usdAsgadAudAciguCCfuUfuuaagscsc -3' (SEQ ID NO: 16), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор А, G, С и U, соответственно; dA представляет собой 2'-дезоксиаденозин-3'-фосфатный нуклеотид; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- csusuaaaAfgGfGfAfcagauuucuaL96-3' (SEQ ID NO:17) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- usdAsgadAudAciguCCfuUfuuaagscsc -3' (SEQ ID NO: 16), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор А, G, С и U, соответственно; dA представляют собой 2'-дезоксиаденозин-3'-фосфатный нуклеотид; s представляет собой фосфоротиоатную связь, и L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипролинол.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- csusuaaaAfgGfGfAfcagauuucua-3' (SEQ ID NO:15) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- usdAsgadAudAciguCCfuUfuuaagscsc -3' (SEQ ID NO: 16, где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор А, G, С и U, соответственно; dA представляют собой 2'-дезоксиаденозин-3'-фосфатный нуклеотид; и s представляет собой фосфоротиоатную связь, где 3'-конец смысловой цепи конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме:



и, где X представляет собой O.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'- CUUAAAAGGGACAGUAUUCUU -3'(SEQ ID NO: 48).

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'- CUUAAAAGGGACAGUAUUCUU -3'(SEQ ID NO: 48).

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- CUUAAAAGGGACAGUAUUCUU -3'(SEQ ID NO: 48).

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'- AAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC -3' (SEQ ID NO: 315).

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'- AAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC -3' (SEQ ID NO: 315).

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 21 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'- AAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC -3' (SEQ ID NO: 315).

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- AAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC -3' (SEQ ID NO: 315).

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- CUUAAAAGGGACAGUAUUCUU -3'(SEQ ID NO:48) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- AAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC -3' (SEQ ID NO: 315).

В одном варианте осуществления смысловая цепь отличается не более чем на 3,

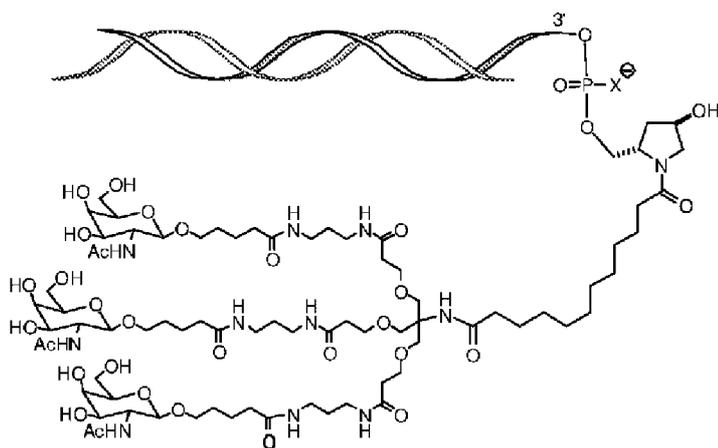
например, 0, 1, 2 или 3 модифицированных нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'- csusuaaaAfgGfGfAfcagauuucu-3' (SEQ ID NO: 377), где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) A, G, C и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U, соответственно; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь отличается не более чем на 3, например, 0, 1, 2 или 3 модифицированных нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'- asdAsgadAudAciguuccCfuUfuuagaascsc -3' (SEQ ID NO: 866), где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) A, G, C и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U, соответственно; dA представляет собой 2'-дезоксиаденозин-3'-фосфатный нуклеотид; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- csusuaaaAfgGfGfAfcagauuucu-3' (SEQ ID NO:377) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- asdAsgadAudAciguuccCfuUfuuagaascsc -3' (SEQ ID NO: 866), где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) A, G, C и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U, соответственно; dA представляет собой 2'-дезоксиаденозин-3'-фосфатный нуклеотид; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- csusuaaaAfgGfGfAfcagauuucuL96-3' (SEQ ID NO: 377) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- asdAsgadAudAciguuccCfuUfuuagaascsc -3' (SEQ ID NO: 866), где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) A, G, C и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U, соответственно; dA представляет собой 2'-дезоксиаденозин-3'-фосфатный нуклеотид; s представляет собой фосфоротиоатную связь, и L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипролинол.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- csusuaaaAfgGfGfAfcagauuucu-3' (SEQ ID NO: 377) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- asdAsgadAudAciguuccCfuUfuuagaascsc -3' (SEQ ID NO: 866), где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) A, G, C и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U, соответственно; dA представляет собой 2'-дезоксиаденозин-3'-фосфатный нуклеотид; и s представляет собой фосфоротиоатную связь, где 3'-конец смысловой цепи конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме:



и, где X представляет собой O.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'-AAAAGGGACAGUAUUCUCAGU-3' (SEQ ID NO: 30).

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'-AAAAGGGACAGUAUUCUCAGU-3' (SEQ ID NO: 30).

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-AAAAGGGACAGUAUUCUCAGU-3' (SEQ ID NO: 30).

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'-ACUGAGAAUACUGUCCCUUUUAA-3' (SEQ ID NO: 31).

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'-ACUGAGAAUACUGUCCCUUUUAA-3' (SEQ ID NO: 31).

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 21 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'-ACUGAGAAUACUGUCCCUUUUAA-3' (SEQ ID NO: 31).

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-ACUGAGAAUACUGUCCCUUUUAA-3' (SEQ ID NO: 31).

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-AAAAGGGACAGUAUUCUCAGU-3' (SEQ ID NO: 30) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-ACUGAGAAUACUGUCCCUUUUAA-3' (SEQ ID NO: 31).

В одном варианте осуществления смысловая цепь отличается не более чем на 3,

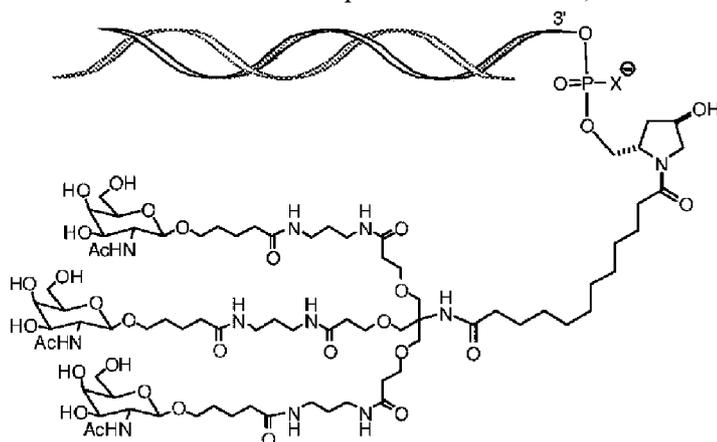
например, 0, 1, 2 или 3 модифицированных нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'-asasaaggGfaCfAfGfuaaucucagu-3' (SEQ ID NO: 350), где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) A, G, C и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U, соответственно; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь отличается не более чем на 3, например, 0, 1, 2 или 3 модифицированных нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'-asCfsugaGfaAfUfacugUfcCfcuuuusasa-3' (SEQ ID NO: 351), где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) A, G, C и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U, соответственно; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-asasaaggGfaCfAfGfuaaucucagu-3' (SEQ ID NO: 350) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-asCfsugaGfaAfUfacugUfcCfcuuuusasa-3' (SEQ ID NO: 351), где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) A, G, C и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U, соответственно; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-asasaaggGfaCfAfGfuaaucucaguL96-3' (SEQ ID NO: 350) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-asCfsugaGfaAfUfacugUfcCfcuuuusasa-3' (SEQ ID NO: 351), где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) A, G, C и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U, соответственно; s представляет собой фосфоротиоатную связь, и L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканоил]-4-гидроксипролинол.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-asasaaggGfaCfAfGfuaaucucagu-3' (SEQ ID NO: 350) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-asCfsugaGfaAfUfacugUfcCfcuuuusasa-3' (SEQ ID NO: 351), где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) A, G, C и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U, соответственно; и s представляет собой фосфоротиоатную связь, где 3'-конец смысловой цепи конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме:



и, где X представляет собой O.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке, где дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности нуклеотидов 429-456 нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2, где по существу все нуклеотиды смысловой цепи и по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации, 2'-фтор-модификации и дезокси-модификации, где как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь независимо дополнительно содержат по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь, и где по меньшей мере одна цепь конъюгирована с лигандом.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит 2-6 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит не более 4 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит 1-5 дезокси-модифицированных нуклеотидов.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к агенту двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке, где агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности нуклеотидов 429-456 нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2, где все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации, 2'-фтор-модификации и дезокси-модификации, где как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь независимо дополнительно содержат по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь, и где по меньшей мере одна цепь конъюгирована с лигандом.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит 2-6 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит 4 2'-фтор-модифицированных нуклеотида.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит 2-4 2'-фтор-модифицированных нуклеотида.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит 2 2'-фтор-модифицированных нуклеотида.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит 1-5 2'-дезоксимо-модифицированных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит 3 2'-дезоксимо-модифицированных нуклеотида.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит 4 2'-фтор-модифицированных нуклеотида в нуклеотидах 7 и 9-11, отсчет от 5'-конца, и антисмысловая цепь содержит 2 2'-фтор-модифицированных нуклеотида в нуклеотидах 14 и 16, отсчет от 5'-конца, и 3 2'-дезоксимо-модифицированных нуклеотида в нуклеотидах 2, 5 и 7, отсчет от 5'-конца.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит две фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи на 5'-конце.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит две фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи как на 5'-, так и на 3'-конце.

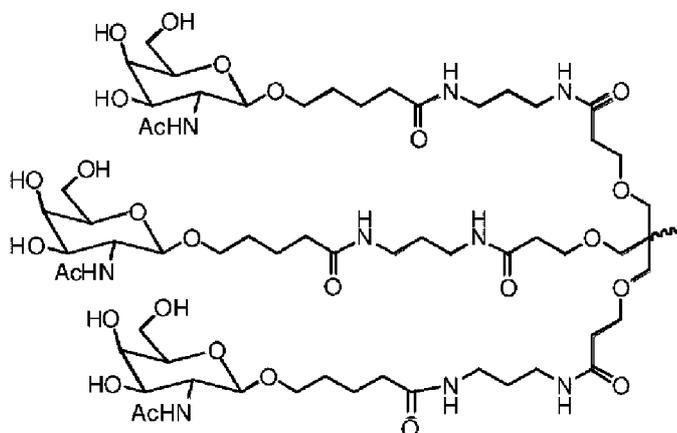
В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит две фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и антисмысловая цепь содержит две фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи как на 5'-, так и на 3'-конце.

В одном варианте осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи.

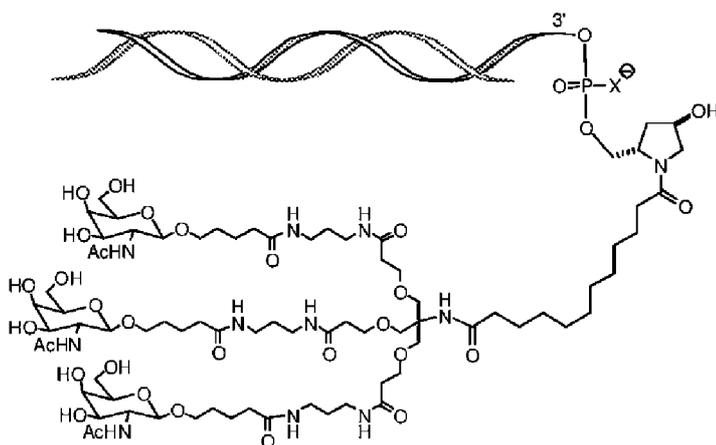
В одном варианте осуществления лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

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

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой



В одном варианте осуществления агент дцРНК конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме



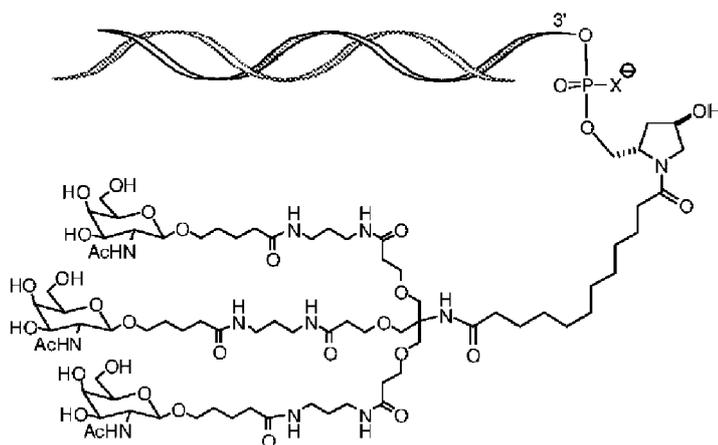
и, где X представляет собой O.

В одном аспекте настоящее изобретение предоставляет агент двухцепочечную рибонуклеиновую кислоту (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке, где агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь отличается не более чем на 3 модифицированных нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'-csusuaaaAfgGfGfAfcaguaauucua-3' (SEQ ID NO:15) и, где антисмысловая цепь отличается не более чем на 3 модифицированных нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'-usdAsgadAudAcuguccCfuUfuuaagscsc-3' (SEQ ID NO:16), где a, g, c и u представляют собой 2'-O-метил (2'-OMe) A, G, C и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U, соответственно; dA представляет собой 2'-дезоксаденозин-3'-фосфатный нуклеотид; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В одном варианте осуществления смысловая цепь отличается не более чем на 2 модифицированных нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'-csusuaaaAfgGfGfAfcaguaauucua-3' (SEQ ID NO:15) и, где антисмысловая цепь отличается не более чем на 2 модифицированных нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'-usdAsgadAudAcuguccCfuUfuuaagscsc-3' (SEQ ID NO:16).

В одном варианте осуществления смысловая цепь отличается не более чем на 1 модифицированный нуклеотид от нуклеотидной последовательности 5'-csusuaaaAfgGfGfAfcaguaauucua-3' (SEQ ID NO:15) и, где антисмысловая цепь отличается не более чем на 1 модифицированный нуклеотид от нуклеотидной последовательности 5'-usdAsgadAudAcuguccCfuUfuuaagscsc-3' (SEQ ID NO:16).

В одном варианте осуществления агент дцРНК конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме



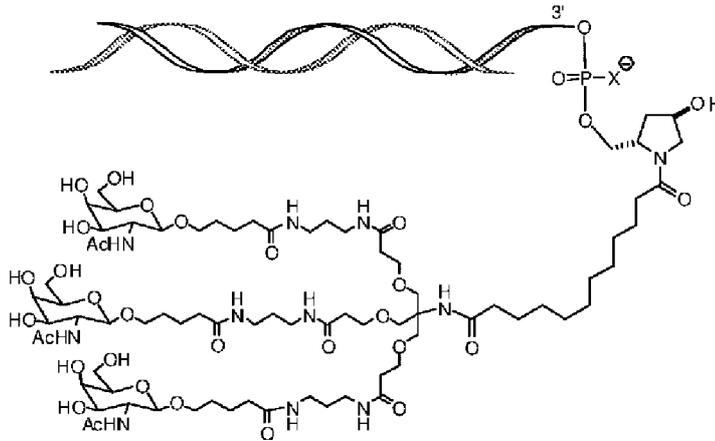
и, где X представляет собой O.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к агенту двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке, где агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- csusuaaaAfgGfGfAfcaguauucua-3' (SEQ ID NO:15) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- usdAsgadAudAcuguccCfuUfuuagaagscsc -3' \*SEQ ID NO:16), где a, g, c и u представляют собой 2'-O-метил (2'-OMe) A, G, C и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U, соответственно; dA представляет собой 2'-дезоксаденозин-3'-фосфатный нуклеотид; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к агенту двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке, где агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- csusuaaaAfgGfGfAfcaguauucuaL96-3' (SEQ ID NO:17) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- usdAsgadAudAcuguccCfuUfuuagaagscsc -3' (SEQ ID NO:16), где a, g, c и u представляют собой 2'-O-метил (2'-OMe) A, G, C и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U, соответственно; dA представляет собой 2'-дезоксаденозин-3'-фосфатный нуклеотид; s представляет собой фосфоротиоатную связь, и L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипролинол.

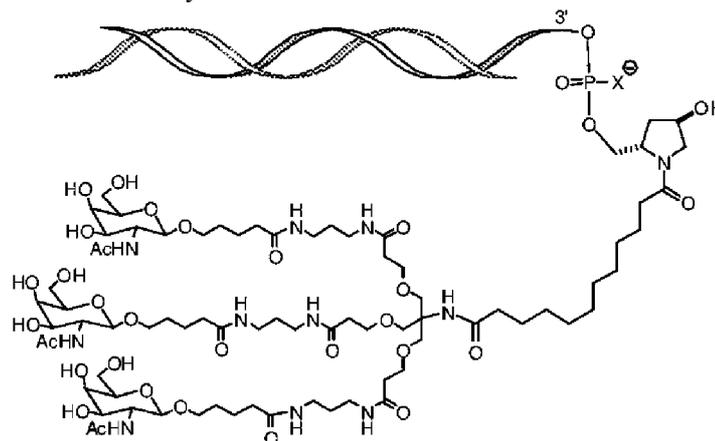
В другом аспекте настоящее изобретение относится к агенту двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке, где агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- csusuaaaAfgGfGfAfcaguauucua-3' (SEQ ID NO:15) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'- usdAsgadAudAcuguccCfuUfuuagaagscsc -3' (SEQ ID NO:16), где a, g, c и u представляют собой 2'-O-метил (2'-OMe) A, G, C и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U, соответственно; dA представляет

собой 2'-дезоксаденозин-3'-фосфатный нуклеотид; и s представляет собой фосфоротиоатную связь; и где 3'-конец смысловой цепи конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме:



, где X представляет собой O.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к агенту двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке, где агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5' - csusuaaaAfgGfGfAfcagauucua-3' (SEQ ID NO:15) и антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5' - usdAsgadAudAcuguccCfuUfuaagscsc-3' (SEQ ID NO:16), где a, g, c и u представляют собой 2'-O-метил (2'-OMe) A, G, C и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U, соответственно; dA представляет собой 2'-дезоксаденозин-3'-фосфатный нуклеотид; и s представляет собой фосфоротиоатную связь; и где 3'-конец смысловой цепи конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме:



, где X представляет собой O.

Настоящее изобретение также относится к клеткам, содержащим любой из агентов дцРНК по изобретению, и фармацевтическим композициям, содержащим любой из агентов дцРНК по изобретению.

Фармацевтическая композиция по изобретению может включать агент дцРНК в забуференном растворе, например, физиологическом растворе или воде, или

фармацевтическая композиция по изобретению может включать агент дцРНК в буферном растворе, например, буферный раствор, содержащий ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию; или забуференный фосфатом солевой раствор (PBS).

В одном аспекте настоящее изобретение предоставляет способ ингибирования экспрессии гена аполипопротеина С3 (АРОС3) в клетке. Способ включает приведение клетки в контакт с любой из дцРНК по изобретению или любой из фармацевтических композиций по изобретению, тем самым ингибируя экспрессию гена АРОС3 в клетке.

В одном варианте осуществления клетка находится внутри субъекта, например, человека-субъекта, например, субъекта, страдающего заболеванием, ассоциированным с аполипопротеином С3, таким как расстройство, ассоциированное с аполипопротеином С3, выбранное из группы, состоящей из гипертриглицеридемии, неалкогольной жировой болезни печени, неалкогольного стеатогепатита, синдрома поликистозных яичников, заболевания почек, ожирения, сахарного диабета 2 типа (инсулинорезистентность), гипертензии, атеросклероза и панкреатита.

В одном варианте осуществления приведение клетки в контакт с агентом дцРНК ингибирует экспрессию АРОС3 по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

В одном варианте осуществления ингибирование экспрессии аполипопротеина С3 снижает уровень белка АРОС3 в сыворотке субъекта по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего расстройством, при котором было бы полезно снижение экспрессии аполипопротеина С3 (АРОС3). Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из дцРНК по изобретению или любой из фармацевтических композиций по изобретению, что позволяет лечить субъекта, страдающего расстройством, для которого было бы полезно снижение экспрессии АРОС3.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего расстройством, при котором может помочь снижение экспрессии аполипопротеина С3 (АРОС3). Способ включает введение субъекту профилактически эффективного количества любой из дцРНК по изобретению или любой из фармацевтических композиций по изобретению, тем самым предотвращая по меньшей мере один симптом у субъекта, страдающего заболеванием, при котором было бы полезно снижение экспрессии АРОС3.

В одном варианте осуществления расстройство представляет собой расстройство, ассоциированное с аполипопротеином С3, например, расстройство, связанное с аполипопротеином С3, выбрано из группы, состоящей из гипертриглицеридемии, неалкогольной жировой болезни печени, неалкогольного стеатогепатита, синдрома поликистозных яичников, заболевания почек, ожирения, сахарного диабета 2 типа (инсулинорезистентность), гипертензии, атеросклероза и панкреатита.

В одном варианте осуществления расстройство, ассоциированное с

аполипопротеином С3, представляет собой гипертриглицеридемию.

В одном варианте осуществления субъект представляет собой человека.

В одном варианте осуществления агент дцРНК вводят субъекту в дозе от примерно 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг.

В одном варианте осуществления агент дцРНК вводят субъекту подкожно.

В одном варианте осуществления способы по изобретению включают дополнительное определение уровня аполипопротеина С3 в образце(образцах) субъекта.

В одном варианте осуществления уровень аполипопротеина С3 в образце(образцах) субъекта представляет собой уровень белка аполипопротеина С3 в образце(образцах) крови или сыворотки.

В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению дополнительно включают введение субъекту дополнительного терапевтического средства. В одном варианте осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой агент дцРНК, нацеленный на PCSK9, например, инклизирин. В одном варианте осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор PCSK9. В одном варианте осуществления ингибитор PCSK9 представляет собой моноклональное антитело против PCSK9, например, эволокумаб (Repatha®) и алирокумаб (Praluent®). В другом варианте осуществления ингибитор PCSK9 представляет собой агент дцРНК, нацеленный на PCSK9, например, инклизирин. В другом варианте осуществления дополнительное терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из ингибитора HMG-CoA-редуктазы, фибрата, секвестрантов желчных кислот, ниацина, антитромбоцитарного средства, ингибитора ангиотензинпревращающего фермента, антагониста рецепторов ангиотензина II, ингибитора ацил-КоА-холестерин-ацетилтрансферазы (ACAT), ингибитора абсорбции холестерина, ингибитора белка переноса холестерилового эфира (CEPT), ингибитора микросомального белка-переносчика триглицеридов (MTTP), модуляторов холестерина, модулятора желчных кислот, агониста рецептора активаторов пролиферации пероксисом (PPAR), генной терапии, составного средства для защиты сосудов, ингибитора гликопротеина IIb/IIIa, аспирина или аспириноподобного соединения, ингибитора IBAT, ингибитора скваленсинтазы, ингибитора моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP)-I или рыбьего жира.

В настоящем изобретении также предоставляются наборы, включающие любую из дцРНК по изобретению или любую из фармацевтических композиций по изобретению, и, необязательно, инструкции по применению.

#### Краткое описание рисунков

Фиг. 1 представляет собой график, показывающий уровни мРНК человеческого АРОС3 у мышей (n=3 в группе), которым подкожно вводили разовую дозу 3 мг/кг указанных дуплексов дцРНК на день 14 после введения дозы. Уровни мРНК человеческого АРОС3 показаны относительно контрольных уровней, обнаруженных при обработке PBS.

Фиг. 2 представляет собой график, показывающий уровни мРНК человеческого АРОС3 у мышей (n=3 в группе), которым подкожно вводили разовую дозу 3 мг/кг

указанных дуплексов дцРНК на день 14 после введения дозы. Уровни мРНК человеческого АРОС3 показаны относительно контрольных уровней, обнаруженных при обработке PBS.

Фиг. 3 представляет собой график, показывающий уровни мРНК человеческого АРОС3 у мышей (n=3 в группе), которым подкожно вводили разовую дозу 3 мг/кг указанных дуплексов дцРНК на день 14 после введения дозы. Уровни мРНК человеческого АРОС3 показаны относительно контрольных уровней, обнаруженных при обработке PBS.

#### Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям иРНК, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцированным сайленсинг-комплексом (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена аполипопротеина С3 (АРО3). Ген может находиться внутри клетки, например, клетки субъекта, такого как человек. Использование этих иРНК делает возможным целенаправленную деградацию мРНК соответствующего гена (гена аполипопротеина С3) у млекопитающих.

иРНК по изобретению были разработаны для нацеливания на ген аполипопротеина С3 человека, включая части гена, которые консервативны в ортологах аполипопротеина С3 других видов млекопитающих. Не желая ограничиваться теорией, считается, что комбинация или субкомбинация вышеуказанных свойств и конкретных сайтов-мишеней или специфических модификаций в этих иРНК придают иРНК по изобретению повышенную эффективность, стабильность, активность, долговечность, и безопасность.

Соответственно, в настоящем изобретении предложены способы лечения и профилактики расстройств, ассоциированных с аполипопротеином С3, например, гипертриглицеридемии, неалкогольной жировой болезни печени, неалкогольного стеатогепатита, синдрома поликистозных яичников, заболевания почек, ожирения, сахарного диабета 2 типа (инсулинорезистентность), гипертензии, атеросклероза и панкреатита, с использованием композиций иРНК, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцированным сайленсинг-комплексом (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена аполипопротеина С3.

иРНК по настоящему изобретению включают цепь РНК (антисмысловую цепь), имеющую участок длиной примерно до 30 нуклеотидов или менее, например, длиной 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотидов, причем этот участок по существу комплементарен по меньшей мере части транскрипта мРНК гена АРОС3.

В некоторых вариантах осуществления одна или обе цепи агентов двухцепочечной РНК по изобретению имеют длину до 66 нуклеотидов, например, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 нуклеотидов, с участком, состоящим по меньшей мере из 19 смежных нуклеотидов, который по существу комплементарен по меньшей мере части транскрипта мРНК гена АРОС3. В некоторых вариантах осуществления такие агенты иРНК, имеющие более длинные антисмысловые цепи, предпочтительно могут включать вторую цепь РНК (смысловую цепь) длиной 20-60 нуклеотидов, где смысловая и антисмысловая цепи

образуют дуплекс из 18-30 смежных нуклеотидов.

Применение иРНК по изобретению обеспечивает целенаправленную деградацию мРНК соответствующего гена (гена аполипопротеина С3) у млекопитающих. Используя анализы *in vitro*, авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что иРНК, нацеленные на ген АРОС3, могут эффективно опосредовать РНКи, что приводит к значительному ингибированию экспрессии гена АРОС3. Таким образом, способы и композиции, включающие эти иРНК, применимы для лечения субъекта, имеющего расстройство, ассоциированное с аполипопротеином С3, например, гипертриглицеридемию, неалкогольную жировую болезнь печени, неалкогольный стеатогепатит, синдром поликистозных яичников, заболевание почек, ожирение, сахарный диабет 2 типа (инсулинорезистентность), гипертензию, атеросклероз и панкреатит.

Соответственно, настоящее изобретение предоставляет способы и комбинированные терапии для лечения субъекта, страдающего расстройством, при котором было бы полезно ингибировать или снижать экспрессию гена АРОС3, например, заболеванием, связанным с аполипопротеином С3, таким как гипертриглицеридемия, неалкогольная жировая болезнь печени, неалкогольный стеатогепатит, синдром поликистозных яичников, заболевание почек, ожирение, сахарный диабет 2 типа (инсулинорезистентность), гипертензия, атеросклероз и панкреатит, с использованием композиций иРНК, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцированным сайленсинг-комплексом (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена АРОС3.

Настоящее изобретение также предоставляет способы предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего расстройством, при котором было бы полезно ингибировать или снижать экспрессию гена АРОС3, например, гипертриглицеридемией, неалкогольной жировой болезнью печени, неалкогольным стеатогепатитом, синдромом поликистозных яичников, заболеванием почек, ожирением, сахарным диабетом 2 типа (инсулинорезистентность), гипертензией, атеросклерозом и панкреатитом. Например, у субъекта, страдающего гипертриглицеридемией, способы по настоящему изобретению могут уменьшить по меньшей мере один симптом у субъекта, например, более низкие уровни триглицеридов.

В следующем подробном описании раскрывается, как получать и применять композиции, содержащие иРНК, для ингибирования экспрессии гена АРОС3, а также композиции, пути применения и способы лечения субъектов, на которые будут оказывать благоприятное воздействие ингибирование и/или снижение экспрессии гена АРОС3, например, субъектов, предрасположенных к расстройству, ассоциированному с аполипопротеином С3, или у кого диагностировано это заболевание.

## I. Определения

Для более легкого понимания настоящего изобретения сначала даны определения некоторых терминов. Кроме того, следует отметить, что при указании значения или диапазона значений параметра подразумевается, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к указанным значениям, также являются частью настоящего

изобретения.

Формы единственного числа используются в настоящем документе для обозначения одного или более чем одного (т.е. по меньшей мере одного) грамматического объекта. Например, «элемент» означает один элемент или более одного элемента, например, множество элементов.

Термин «включая» используется в настоящем документе для обозначения и используется взаимозаменяемо с фразой «включая, но не ограничиваясь этим».

Термин «или» используется в настоящем документе для обозначения и используется взаимозаменяемо с термином «и/или», если контекст явно не указывает на иное. Например, «смысловая цепь или антисмысловая цепь» понимается как «смысловая цепь или антисмысловая цепь или смысловая цепь и антисмысловая цепь».

Термин «около» используется в настоящем документе для обозначения типичных диапазонов допусков в данной области. Например, «около» можно понимать как около 2 стандартных отклонений от среднего значения. В некоторых вариантах осуществления около означает  $\pm 10\%$ . В некоторых вариантах осуществления около означает  $\pm 5\%$ . Когда около присутствует перед рядом чисел или диапазоном, подразумевается, что «около» может модифицировать каждое из чисел в ряду или диапазоне.

Под термином «по меньшей мере» перед числом или серией чисел понимается число, стоящее рядом с термином «по меньшей мере», и все последующие числа или целые числа, которые логически могут быть включены, как ясно из контекста. Например, количество нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты должно быть целым числом. Например, «по меньшей мере 19 нуклеотидов из молекулы 21 нуклеотидной нуклеиновой кислоты» означает, что 19, 20 или 21 нуклеотидов обладают указанным свойством. Когда по меньшей мере присутствует перед рядом чисел или диапазоном, подразумевается, что «по меньшей мере» может изменить каждое из чисел в ряду или диапазоне.

Используемые в настоящем документе термины «не более чем» или «менее чем» понимаются как значение, примыкающее к фразе, и логические меньшие значения или целые числа, как логические из контекста, до нуля. Например, дуплекс с выступающим «не более чем 2 нуклеотидами» имеет 2, 1 или 0 выступающих нуклеотида. Когда «не более чем» присутствует перед рядом чисел или диапазоном, подразумевается, что «не более чем» может изменить каждое из чисел в ряду или диапазоне. Используемые в настоящем документе диапазоны включают как верхний, так и нижний предел.

Используемые в настоящем документе способы обнаружения могут включать определение того, что количество присутствующего аналита ниже уровня обнаружения способа.

В случае противоречия между указанным сайтом-мишенью и нуклеотидной последовательностью для смысловой или антисмысловой цепи, указанная последовательность имеет преимущество.

В случае противоречия между последовательностью и ее указанным участком в транскрипте или другой последовательности преимущество имеет нуклеотидная

последовательность, указанная в описании.

Используемый в настоящем документе термин «АРОС3» относится к хорошо известному гену, который кодирует аполипопротеин С3, а также к его белковому продукту, также известному в данной области как HALP2 или АРОСIII.

Термин «АРОС3» включает человеческий АРОС3, аминокислоту и полную кодирующую последовательность которого можно найти, например, по GenBank Accession No. GI:4557322 (NM\_000040.3; SEQ ID NO:1; обратный комплемент, SEQ ID NO:2); АРОС3 *Macaca fascicularis*, аминокислоту и полную кодирующую последовательность которого можно найти, например, по GenBank Accession No. GI:544489959 (XM\_05579730.1, SEQ ID NO:3; обратный комплемент, SEQ ID NO:4); АРОС3 *Macaca mulatta*, аминокислоту и полную кодирующую последовательность которого можно найти, например, по GenBank Accession No. GI:297269260 (XM\_001090312.4; SEQ ID NO: 5; обратный комплемент, SEQ ID NO:6); АРОС3 мыши (*Mus musculus*), аминокислоту и полную кодирующую последовательность которого можно найти, например, по GenBank Accession No. GI:577019555 (NM\_023114.4, SEQ ID NO:7; обратный комплемент, SEQ ID NO:8); АРОС3 крысы (*Rattus norvegicus*), аминокислоту и полную кодирующую последовательность которого можно найти, например, по GenBank Accession No. GI:402534545 (NM\_012501.2, SEQ ID NO:9; обратный комплемент, SEQ ID NO:2-10); и кролика (*Oryctolagus cuniculus*), GenBank Accession No. GI:655601498 (XM\_002708371.3, SEQ ID NO:11; обратный комплемент, SEQ ID NO:12).

Дополнительную информацию о АРОС3 можно найти, например, на сайте [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/345](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/345).

Дополнительные примеры последовательностей мРНК АРОС3 легко доступны в общедоступных базах данных, например, GenBank, UniProt, OMIM и на веб-сайте проекта генома *Macaca*.

Термин «АРОС3», используемый в настоящем документе, также относится к встречающимся в природе вариациям последовательности ДНК гена АРОС3, таким как однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в гене АРОС3. Примеры SNP в последовательности ДНК АРОС3 можно найти в базе данных dbSNP, доступной на сайте [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/). Неограничивающие примеры вариаций последовательности в гене АРОС3 включают, например, две вариации rs2854116 и rs2854117, описанные в Petersen, K.F. *et al.*, (2010), *N. Engl. J. Med.* 362(12):1082-1089, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Примеры нуклеотидных последовательностей АРОС3 также представлены в SEQ ID NO:1-12. SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10 и 12 представляют собой обратные комплементарные последовательности SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9 и 11, соответственно.

Полное содержание каждого из вышеуказанных номеров GenBank Accession и номеров базы данных Gene включено в настоящий документ посредством ссылки на дату подачи настоящей заявки. Используемый в настоящем документе термин «последовательность-мишень» относится к непрерывной части нуклеотидной

последовательности молекулы мРНК, образованной в процессе транскрипции гена аполипопротеина С3, включая мРНК, которая является продуктом процессинга РНК первичного продукта транскрипции. Целевая часть последовательности будет, по меньшей мере, достаточно длинной, чтобы служить субстратом для направленного иРНК расщепления на той части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, которая образуется во время транскрипции гена АРОС3, или рядом с ней. В одном варианте осуществления последовательность-мишень находится в кодирующей белок области АРОС3.

Последовательность-мишень может иметь длину около 19-36 нуклеотидов, например, длину предпочтительно около 19-30 нуклеотидов. Например, последовательность-мишень может иметь длину около 19-30 нуклеотидов, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень может иметь длину 19-23 нуклеотида, необязательно 21-23 нуклеотида. Также подразумевают, что диапазоны и длины, промежуточные по отношению к указанным выше диапазонам и длинам, являются частью настоящего изобретения

Используемый в настоящем документе термин «цепь, содержащая последовательность» относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которая описывается последовательностью, обозначаемой с использованием стандартной номенклатуры нуклеотидов.

“G,” “C,” “A,” “T,” и “U”, как правило, каждый обозначает нуклеотид, который содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил в качестве основания, соответственно. Однако следует понимать, что термин «рибонуклеотид» или «нуклеотид» может также относиться к модифицированному нуклеотиду, как более подробно описано ниже, или к группе заместителя-имитатора (см., например, таблицу 1). Специалисту в данной области хорошо понятно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть замещены другими группами по существу без изменения свойств спаривания оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такую группу замещения. Например, без ограничения, нуклеотид, содержащий инозин в качестве своего основания, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Таким образом, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть заменены в нуклеотидных последовательностях дцРНК, представленных в изобретении, нуклеотидом, содержащим, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любом месте олигонуклеотида могут быть заменены гуанином и урацилом, соответственно, с образованием неоднозначной пары оснований G-U с мРНК-мишенью. Последовательности, содержащие такие замещающие группы, подходят для композиций и способов, представленных в изобретении.

Термины «иРНК», «агент РНКи», «агент иРНК», «агент РНК-интерференции», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к агенту, который

содержит РНК, как этот термин определен в настоящем документе, и который опосредует направленное расщепление РНК-транскрипта посредством пути РНК-индуцированного сайленсинг-комплекса (RISC). иРНК опосредует последовательность-специфичную деградацию мРНК посредством процесса, известного как РНК-интерференция (РНКи). иРНК модулирует, например, ингибирует экспрессию гена аполипопротеина С3 в клетке, например, в клетке субъекта, такого как субъект-млекопитающее.

В одном варианте осуществления агент РНКи по изобретению включает одноцепочечную РНК, которая взаимодействует с последовательностью РНК-мишени, например, последовательностью мРНК-мишени аполипопротеина С3, опосредуя расщепления РНК-мишени. Не желая быть связанными теорией, считается, что длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, расщепляется на миРНК эндонуклеазой типа III, известной как Dicer (Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, фермент, подобный рибонуклеазе-III, процессирует дцРНК до коротких интерферирующих РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными 3'-выступающими концами из двух оснований (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). Затем миРНК включается в РНК-индуцированный сайленсинг-комплекс (RISC), где одна или несколько хеликаз расплетают дуплекс миРНК, позволяя комплементарной антисмысловой цепи обеспечивать распознавание мишени (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). При связывании с соответствующей мРНК-мишенью одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень, индуцируя сайленсинг (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188). Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к одноцепочечной РНК (миРНК), образовавшейся в клетке, которая обеспечивает образование комплекса RISC для подавления гена-мишени, т.е. гена аполипопротеина С3 (АРОС3). Соответственно, термин «миРНК» также используют в настоящем документе для обозначения иРНК, как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления агент РНКи может представлять собой одноцепочечную миРНК (оцРНКи), которую вводят в клетку или организм для ингибирования мРНК-мишени. Агенты одноцепочечная РНКи связываются с эндонуклеазой RISC, Argonaute 2, которая затем разрушает мРНК-мишень. Одноцепочечные миРНК, как правило, имеют 15-30 нуклеотидов и являются химически модифицированными. Конструирование и тестирование одноцепочечных миРНК описаны в патенте США No. 8101348 и в Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Любую из антисмысловых нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе, может использовать в виде одноцепочечной миРНК, как описано в настоящем документе, или как химически модифицировано способами, описанными в Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894.

В некоторых вариантах осуществления «иРНК» для применения в композициях, применениях и способах по изобретению представляет собой двухцепочечную РНК и обозначается в настоящем документе как «агент двухцепочечная РНК», «двухцепочечной молекула РНК (дцРНК)», «агент дцРНК» или «дцРНК». Термин «дцРНК» относится к

комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющих дуплексную структуру, содержащую две антипараллельных и по существу комплементарных цепи нуклеиновой кислоты, обозначаемые как имеющие «смысловую» и «антисмысловую» ориентацию по отношению к РНК-мишени, т.е. гена аполипопротеина С3 (АРОС3). В некоторых вариантах осуществления изобретения двухцепочечная РНК (дцРНК) запускает деградацию РНК-мишени, например, мРНК, посредством механизма посттранскрипционного сайленсинга генов, обозначаемого в настоящем документе РНК-интерференция или РНКи.

Как правило, большинство нуклеотидов каждой цепи молекулы дцРНК представляют собой рибонуклеотиды, но, как подробно описано в настоящем документе, каждая или обе цепи могут также включать один или несколько нерибонуклеотидов, например, дезоксирибонуклеотид или модифицированный нуклеотид. Кроме того, как используется в настоящем описании, «иРНК» может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; иРНК может включать существенные модификации во многих нуклеотидах. Используемый в настоящем документе термин «модифицированный нуклеотид» относится к нуклеотиду, имеющему независимо модифицированный сахарный фрагмент, модифицированную межнуклеотидную связь или модифицированное нуклеооснование, или любую их комбинацию. Таким образом, термин модифицированный нуклеотид включает замену, добавление или удаление, например, функциональной группы или атома межнуклеозидных связей, фрагментов сахара или нуклеооснований. Модификации, подходящие для использования в агентах по изобретению, включают все типы модификаций, раскрытых в настоящем документе или известных в данной области. Любые такие модификации, используемые в молекуле типа миРНК, охватываются терминами «иРНК» или «агент РНК-интерференции» в контексте настоящего описания и формулы изобретения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения включение дезоксинуклеотида, если он присутствует в агенте РНК-интерференции, может рассматриваться как составляющее модифицированный нуклеотид.

Дуплексная область может иметь любую длину, которая обеспечивает специфическую деградацию желаемой РНК-мишени посредством пути RISC, и может иметь длину в пределах от около 19 до 36 пар оснований, например, длину около 19-30 пар оснований, например, около 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 пар оснований, как например, около 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, или 21-22 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления дуплексная область имеет длину 19-21 пар оснований, например, 21 пару оснований. Также подразумевают, что диапазоны и длины, промежуточные по отношению к указанным выше диапазонам и длинам, являются частью настоящего изобретения.

Две цепи, образующие дуплексную структуру, могут представлять собой различные части одной более крупной молекулы РНК или отдельные молекулы РНК. Когда две цепи

являются частью одной более крупной молекулы и, таким образом, соединены непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующей дуплексную структуру, соединяющую цепь РНК обозначают «петля шпильки». Петля шпильки может содержать по меньшей мере один неспаренный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления петля шпильки может содержать по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 23 или более неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петля шпильки может состоять из 10 или менее нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петля шпильки может состоять из 8 или менее неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петля шпильки может состоять из 4-10 неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петля шпильки может состоять из 4-8 нуклеотидов.

Когда две по существу комплементарных цепи двухцепочечной РНК содержатся в отдельных молекулах РНК, эти молекулы не должны, но могут быть ковалентно связанными. Когда две цепи связаны ковалентно способом, отличным от непрерывной цепи нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующей дуплексную структуру, соединяющую структуру называют «линкером». Цепи РНК могут иметь одинаковое или разное количество нуклеотидов. Максимальное количество пар оснований равно количеству нуклеотидов в самой короткой цепи дцРНК минус любые выступающие концы, которые присутствуют в дуплексе. В дополнение к дуплексной структуре РНКи может содержать один или несколько нуклеотидных выступающих концов. В одном варианте осуществления агента РНКи по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. В другом варианте осуществления, по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, или 15 нуклеотидов. В других вариантах осуществления, по меньшей мере одна цепь агента РНКи содержит 5'-выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна цепь содержит 5'-выступающий конец из по меньшей мере 2 нуклеотидов, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В других вариантах осуществления как 3'-, так и 5'-концы одной цепи агента РНК-и содержат выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления агент иРНК по изобретению представляет собой дцРНК, каждая цепь которой содержит 19-23 нуклеотида, которая взаимодействует с последовательностью РНК-мишени, например, геном аполипопротеина С3 (АРОС3), для прямого расщепления РНК-мишени.

В некоторых вариантах осуществления иРНК по изобретению представляет собой дцРНК из 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с последовательностью РНК-мишени, например, последовательностью мРНК-мишени АРОС3, для направления расщепления РНК-мишени.

Используемый в настоящем документе термин «нуклеотидный выступающий конец» относится по меньшей мере к одному неспаренному нуклеотиду, который выступает

из дуплексной структуры двухцепочечной иРНК. Например, когда 3'-конец одной цепи дцРНК продолжается за пределами 5'-конца другой цепи или наоборот, возникает нуклеотидный выступающий конец. дцРНК может содержать выступающий конец из по меньшей мере одного нуклеотида; альтернативно выступающий конец может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или более. Нуклеотидный выступающий конец может содержать или состоять из нуклеотидного/нуклеозидного аналога, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Выступающий конец(концы) может быть на смысловой цепи, на антисмысловой цепи или на любой их комбинации. Более того, нуклеотид(ы) выступающего конца могут находиться на 5'-конце, на 3'-конце или на обоих концах либо антисмысловой, либо смысловой цепи дцРНК.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь дцРНК имеет выступающий конец из 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, на 3'-конце или на 5'-конце. В одном варианте осуществления смысловая цепь дцРНК имеет выступающий конец из 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, на 3'-конце или на 5'-конце. В другом варианте осуществления один или несколько из нуклеотидов выступающего конца заменены нуклеозидтиофосфатом.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь дцРНК имеет выступающий конец из 1-10 нуклеотидов, например, 0-3, 1-3, 2-4, 2-5, 4-10, 5-10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, на 3'-конце или на 5'-конце. В одном варианте осуществления смысловая цепь дцРНК имеет выступающий конец из 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, на 3'-конце или на 5'-конце. В другом варианте осуществления один или несколько из нуклеотидов выступающего конца заменены нуклеозидтиофосфатом.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь дцРНК имеет выступающий конец из 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, на 3'-конце или на 5'-конце. В некоторых вариантах осуществления выступающий конец на смысловой цепи или на антисмысловой цепи, или на обеих, может включать удлиненный участки длиной более 10 нуклеотидов, например, 1-30 нуклеотидов, 2-30 нуклеотидов, 10-30 нуклеотидов, 10-25 нуклеотидов, 10-20 нуклеотидов или 10-15 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления удлиненный выступающий конец находится на смысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлиненный выступающий конец находится на 3'-конце смысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлиненный выступающий конец находится на 5'-конце смысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлиненный выступающий конец находится на антисмысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлиненный выступающий конец находится на 3'-конце антисмысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлиненный выступающий конец находится на 5'-конце антисмысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления один или несколько нуклеотидов в удлиненном выступающем конце

заменены нуклеозидтиофосфатом. В некоторых вариантах осуществления выступающий конец включает самокомплементарную часть, так что выступающий конец способен образовывать шпилькообразную структуру, стабильную в физиологических условиях.

«Тупой» или «тупой конец» означает, что не существует неспаренных нуклеотидов на данном конце двухцепочечного РНК-агента, т.е. не существует нуклеотидного выступающего конца. Агент двухцепочечная РНК с «тупыми концами» является двухцепочечным по всей его длине, т.е. отсутствует нуклеотидный выступ на каком-либо из концов молекулы. Агенты РНКи по изобретению включают агенты РНКи без нуклеотидного выступающего конца на одном конце (т.е. агенты с одним выступающим концом и одним тупым концом) или без нуклеотидного выступающего конца на обоих концах. Наиболее часто такая молекула будет двухцепочечной по всей своей длине.

Термин «антисмысловая цепь» или «направляющая цепь» относится к цепи иРНК, например, дцРНК, которая включает область, которая по существу комплементарна последовательности-мишени, например, мРНК АРОС3.

Используемый в настоящем документе термин «область комплементарности» относится к области на антисмысловой цепи, которая по существу комплементарна последовательности, например, последовательности-мишени, например, нуклеотидной последовательности аполипопротеина С3, как определено в настоящем документе. Когда область комплементарности не полностью комплементарна последовательности-мишени, нарушения комплементарности могут находиться во внутренних или на концевых участках молекулы. Как правило, наиболее допустимые нарушения комплементарности находятся на концевых участках, например, в пределах 5, 4 или 3 нуклеотидов от 5'- или 3'-конца иРНК. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный РНК-агент по изобретению включает нарушение комплементарности нуклеотидов в антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь двухцепочечного РНК-агента по изобретению включает не более 4 нарушений комплементарности с мРНК-мишенью, например, антисмысловая цепь включает 4, 3, 2, 1 или 0 нарушения комплементарности с мРНК-мишенью. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный РНК-агент с антисмысловой цепью по изобретению включает не более 4 нарушений комплементарности со смысловой цепью, например, антисмысловая цепь включает 4, 3, 2, 1 или 0 нарушений комплементарности со смысловой цепью. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный РНК-агент по изобретению включает нарушения комплементарности нуклеотидов в смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь двухцепочечного РНК-агента по изобретению включает не более 4 нарушений комплементарности с антисмысловой цепью, например, смысловая цепь включает 4, 3, 2, 1 или 0 нарушения комплементарности с антисмысловой цепью. В некоторых вариантах осуществления нарушение комплементарности нуклеотидов находится, например, в пределах 5, 4, 3 нуклеотидов от 3'-конца иРНК. В другом варианте осуществления нарушение комплементарности нуклеотидов находится, например, на 3'-концевом нуклеотиде агента иРНК. В некоторых вариантах осуществления нарушение(нарушения)

комплементарности отсутствует в области узнавания мишени.

Таким образом, агент РНКи, описанный в настоящем документе, может содержать одно или несколько нарушений комплементарности с последовательностью-мишенью. В одном варианте осуществления агент РНКи, как описано в настоящем документе, содержит не более 3 нарушений комплементарности (т.е. 3, 2, 1 или 0 несоответствий). В одном варианте осуществления агент РНКи, как описано в настоящем документе, содержит не более 2 нарушений комплементарности. В одном варианте осуществления агент РНКи, как описано в настоящем документе, содержит не более 1 нарушения комплементарности. В одном варианте осуществления агент РНКи, как описано в настоящем документе, содержит 0 нарушений комплементарности. В некоторых вариантах осуществления, если антисмысловая цепь агента РНКи содержит нарушения комплементарности с последовательностью-мишенью, это нарушение комплементарности может быть необязательно ограничено последними 5 нуклеотидами от 5'- или от 3'-конца области комплементарности. Например, в таких вариантах осуществления для агента РНК-интерференции из 23 нуклеотидов цепь, которая является комплементарной области гена АРОС3, обычно не содержит какого-либо нарушения комплементарности в пределах центральных 13 нуклеотидов. Способы, описанные в настоящем документе, или способы, известные в данной области, можно использовать для определения является ли агент РНКи, содержащий нарушение комплементарности с последовательностью-мишенью, эффективным для ингибирования экспрессии гена АРОС3. Оценка эффективности агентов РНКи с нарушениями комплементарности при ингибировании экспрессии гена АРОС3 является важной, особенно, если известно, что конкретная область комплементарности в гене АРОС3 обладает полиморфной изменчивостью последовательности в популяции.

Термин «смысловая цепь» или «пассажирская цепь», используемый в настоящем документе, относится к цепи иРНК, которая включает область, которая по существу комплементарна области антисмысловой цепи, как этот термин определен в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин «практически все нуклеотиды модифицированы» в значительной степени, но не полностью модифицированы, и может включать не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированных нуклеотидов.

Используемый в настоящем документе термин «область расщепления» относится к области, которая располагается непосредственно вблизи участка расщепления. Участок расщепления представляет собой участок в мишени, в котором происходит расщепление. В некоторых вариантах осуществления область расщепления содержит три основания на конце и непосредственно вблизи участка расщепления. В некоторых вариантах осуществления область расщепления содержит два основания на конце и непосредственно вблизи участка расщепления. В некоторых вариантах осуществления участок расщепления конкретно располагается на участке, связанном нуклеотидами 10 и 11 антисмысловой цепи, и область расщепления содержит нуклеотиды 11, 12 и 13.

Используемый в настоящем документе и если не указано иное, термин

«комплементарный», когда его используют для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности, относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, включающего первую нуклеотидную последовательность, гибридизоваться и образовывать дуплексную структуру в определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, как будет понятно специалисту в данной области. Такие условия могут, например, представлять собой жесткие условия, где жесткие условия могут включать: 400 мМ NaCl, 40 мМ PIPES pH 6,4, 1 мМ EDTA, 50°C или 70°C в течение 12-16 часов с последующим промыванием (см., например, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, *et al.* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Можно использовать другие условия, такие как соответствующие физиологическим условиям, как могут встречаться внутри организма. Специалист может определять набор условий, наиболее подходящих для тестирования комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизуемых нуклеотидов.

Комплементарные последовательности в иРНК, например, в dsRNA, как описано в настоящем документе, включают спаривание оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, на протяжении всей длины одной или обеих нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности могут называться «полностью комплементарными» по отношению друг к другу в настоящем документе. Однако, когда первую последовательность обозначают в настоящем документе как «по существу комплементарная» по отношению ко второй последовательности, две последовательности могут быть полностью комплементарными, или они при гибридизации могут образовывать одну или несколько, но обычно не более 5, 4, 3 или 2 несоответствующих пар оснований, для дуплекса из вплоть до 30 пар оснований, при сохранении способности гибридизоваться в условиях, наиболее подходящих для их конечного применения, например, ингибирование экспрессии генов через путь RISC. Однако, когда два олигонуклеотида сконструированы таким образом, что при гибридизации образуют один или несколько одноцепочечных выступающих концов, такие выступающие концы не будут считаться несоответствиями с точки зрения определения комплементарности. Например, дцРНК, содержащая один олигонуклеотид длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид длиной 23 нуклеотида, где более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, все же может называться «полностью комплементарной» для цели, описанные в настоящем документе.

«Комплементарные» последовательности, как используется в настоящем документе, могут также включать или могут быть полностью образованы из пар оснований, не являющихся парами оснований Уотсона-Крика, или пар оснований, образованных из неприродных и модифицированных нуклеотидов, в той мере, в какой вышеприведенные

требования в отношении их способности гибридизоваться удовлетворяются. Такие пары оснований, не являющиеся парами оснований Уотсона-Крика, включают, но не ограничиваются ими, спаривание оснований G:U Wobble или по Хугстину.

Термины «комплементарный», «полностью комплементарный» и «по существу комплементарный» в настоящем документе можно использовать в отношении соответствия оснований между смысловой цепью и антисмысловой цепью дцРНК, или между антисмысловой цепью двухцепочечного РНК-агента и последовательностью-мишенью, как будет понятно из контекста их применения.

Как используется в настоящем документе, полинуклеотид, который является «по существу комплементарным по меньшей мере части» матричной РНК (мРНК), относится к полинуклеотиду, который по существу комплементарен непрерывной части представляющей интерес мРНК (например, мРНК, кодирующей ген аполипопротеина С3). Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части мРНК аполипопротеина С3, если последовательность по существу комплементарна непрерываемой части мРНК, кодирующей ген аполипопротеина С3.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, полностью комплементарны целевой последовательности АРОС3. В других вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, по существу комплементарны последовательности АРОС3-мишени и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентна участку нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9 или 11, или фрагмента любой из SEQ ID NO: 1-1, 3, 5, 7, 9 или 11, как например, комплементарна на примерно 85%, на примерно 90%, на примерно 91%, на примерно 92%, на примерно 93%, на примерно 94%, на примерно 95%, на примерно 96%, на примерно 97%, на примерно 98% или на примерно 99%.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, по существу комплементарны фрагменту последовательности АРОС3-мишени и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по крайней мере на 80% комплементарна по всей своей длине фрагменту SEQ ID NO:1, выбранному из группы нуклеотидов; 232-254; 233-255; 238-260; 239-261; 242-264; 243-265; 244-266; 264-286; 268-290; 426-448; 431-453; 432-454; 433-455; 435-457; 436-458; 499-521; 500-522; 503-525; 504-526; 507-529; 510-532; и 511-533 SEQ ID NO:1, как например, комплементарна на примерно 85%, на примерно 90%, на примерно 91%, на примерно 92%, на примерно 93%, на примерно 94%, на примерно 95%, на примерно 96%, на примерно 97%, на примерно 98% или на примерно 99%.

В других вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, по существу комплементарны фрагменту последовательности АРОС3-мишени и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине фрагменту SEQ ID NO:1,

выбранному из группы нуклеотидов 235-257; 238-260; 242-264; 243-265; 244-266; 426-448; 430-450; 431-453; 432-454; 433-455; 435-457; 436-458; 499-521; 503-525; и 504-526 SEQ ID NO: 1, как например, комплементарна на примерно 85%, на примерно 90%, на примерно 91%, на примерно 92%, на примерно 93%, на примерно 94%, на примерно 95%, на примерно 96%, на примерно 97%, на примерно 98% или на примерно 99%. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, по существу комплементарны фрагменту последовательности АРОС3-мишени и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине фрагменту SEQ ID NO:1, выбранному из группы нуклеотидов 232-254; 239-261; 242-264; 244-266; 258-280; 264-286; 268-290; 429-451; 430-450; 430-452; 433-455; 434-456; 435-457; 500-522; 503-525; 507-529; и 510-532; и 504-526 SEQ ID NO: 1, как например, комплементарна на примерно 85%, на примерно 90%, на примерно 91%, на примерно 92%, на примерно 93%, на примерно 94%, на примерно 95%, на примерно 96%, на примерно 97%, на примерно 98% или на примерно 99%.

В других вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, по существу комплементарны фрагменту последовательности АРОС3-мишени и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине фрагменту SEQ ID NO:1, выбранному из группы нуклеотидов 429-451; 430-452; 431-451; 432-452; 433-455; 504-526; и 506-526 SEQ ID NO: 1, как например, комплементарна на примерно 85%, на примерно 90%, на примерно 91%, на примерно 92%, на примерно 93%, на примерно 94%, на примерно 95%, на примерно 96%, на примерно 97%, на примерно 98% или на примерно 99%.

В других вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, по существу комплементарны последовательности АРОС3-мишени и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи в любой из таблиц 2-5, 14 и 15, или фрагменту любой из нуклеотидных последовательностей смысловой нити в любой из таблиц 2-5, 14 и 15, как например, комплементарна на примерно 85%, на примерно 90%, на примерно 91%, на примерно 92%, на примерно 93%, на примерно 94%, на примерно 95%, на примерно 96%, на примерно 97%, на примерно 98%, на примерно 99% или 100%.

В одном варианте осуществления агент РНКи по настоящему изобретению включает смысловую цепь, которая по существу комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, является таким же, как последовательность АРОС3-мишень, и где полинуклеотид смысловой цепи содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на примерно 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентному участку нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 или 12 или фрагменту любой из SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10 или 12, как например, комплементарна на примерно 85%, на примерно 90%, на примерно 91%, на примерно 92%, на примерно 93%, на примерно 94%, на примерно 95%, на примерно 96%, на примерно 97%,

на примерно 98%, на примерно 99% или 100%.

В некоторых вариантах осуществления иРНК по изобретению включает смысловую цепь, которая по существу комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, комплементарен последовательности-мишени аполипопротеина С3, и где полинуклеотид смысловой цепи содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на примерно 80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи в любой из таблиц 2-5, 14 и 15 или фрагменту любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи в любой из таблиц 2-5, 14 и 15, как например, комплементарна на примерно 85%, на примерно 90%, на примерно 91%, на примерно 92%, на примерно 93%, на примерно 94%, на примерно 95%, на примерно 96%, на примерно 97%, на примерно 98%, на примерно 99% или 100%

В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи выбраны из любого из дуплексов AD-959917.1; AD-959918.1; AD-960096.1; AD-960064.1; AD-959914.1; AD-959941.1; AD-960031.1; AD-960063.1; AD-960293.1; AD-960288.1; AD-960445.1; AD-960292.1; AD-960475.1; AD-960442.1; AD-960470.1; AD-960436.1; AD-960446.1; AD-960474.1; AD-960294.1; AD-960471.1; AD-960314.1; AD-960443.1; AD-960282.1; AD-960283.1; AD-80794.7; AD-960478.1; AD-960481.1; или AD-960482.1.

В других вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи выбраны из любого из дуплексов AD-959917.1; AD-960064.1; AD-960031.1; AD-960063.1; AD-960293.1; AD-960288.1; AD-960445.1; AD-960292.1; AD-960475.1; AD-960442.1; AD-960470.1; AD-960436.1; AD-960446.1; AD-960474.1; AD-960294.1; AD-960443.1; AD-80794.7; и AD-959910.1.

В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи выбраны из любого из дуплексов AD-80794.8; AD-959907.2; AD-959914.2; AD-959916.2; AD-959932.2; AD-960314.2; AD-959941.2; AD-960030.2; AD-960062.2; AD-960064.2; AD-960065.2; AD-960066.2; AD-960294.2; AD-960471.2; AD-960474.2; AD-960478.2; и AD-960481.2.

В других вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи выбраны из любого из дуплексов AD-960030; AD-1143243; AD-1143245; AD-1143247; AD-1143249; AD-1143256; AD-1143260; AD-1143278; AD-1143287; AD-1143295; AD-1143299; AD-1143302; и AD-1143305.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая цепи представляют собой дуплекс AD-1143243.

Как правило, «иРНК» включает рибонуклеотиды с химическими модификациями. Такие модификации могут включать все типы модификаций, раскрытые в настоящем документе или известные в данной области техники. Любые такие модификации, используемые в молекуле дцРНК, охватываются термином «иРНК» в контексте настоящего описания и формулы изобретения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, включение

дезоксинуклеотида, если он присутствует в агенте РНК-и, может рассматриваться как составляющее модифицированный нуклеотид.

В одном аспекте изобретения агент для применения в способах и композициях по изобретению представляет собой молекулу одноцепочечного антисмыслового олигонуклеотида, которая ингибирует мРНК-мишень посредством механизма антисмыслового ингибирования. Молекула одноцепочечного антисмыслового олигонуклеотида комплементарна последовательности мРНК-мишени. Одноцепочечные антисмысловые олигонуклеотиды могут ингибировать трансляцию стехиометрическим образом путем спаривания оснований с мРНК и физического нарушения механизма трансляции, см. Dias, N. *et al.*, (2002) *Mol Cancer Ther* 1:347-355. Молекула одноцепочечного антисмыслового олигонуклеотида может иметь длину от примерно 14 до примерно 30 нуклеотидов и иметь последовательность, комплементарную последовательности-мишени. Например, молекула одноцепочечного антисмыслового олигонуклеотида может содержать последовательность, которая содержит по меньшей мере примерно 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных нуклеотидов из любой из антисмысловых последовательностей, описанных в настоящем документе.

Фраза «приведение клетки в контакт с иРНК», такой как дцРНК, используемая в данном документе, включает приведение клетки в контакт любым возможным способом. Приведение клетки в контакт с иРНК включает приведение клетки в контакт *in vitro* с иРНК или приведение клетки в контакт *in vivo* с иРНК. Приведение в контакт можно осуществлять прямо или опосредованно. Таким образом, например, иРНК можно приводить в физический контакт с клеткой отдельно проводимым способом, или, альтернативно, для иРНК можно создавать ситуацию, которая обеспечивает или вызывает в дальнейшем его контактирование с клеткой.

Приведение клетки в контакт *in vitro* можно осуществлять, например, путем инкубации клеток с иРНК. Приведение клетки в контакт *in vivo* можно осуществлять, например, путем инъекционного введения иРНК в ткань или около нее, где локализована клетка, или путем инъекционного введения иРНК в другую область, например, кровотока или подкожное пространство, таким образом, что агент затем попадает в ткань, где локализована клетка, которую необходимо подвергать контактированию. Например, иРНК может содержать или являться сопряженным с лигандом, например, GalNAc, который направляет иРНК в представляющий интерес участок, например, печень. Также возможными являются комбинации способов *in vitro* и *in vivo*. Например, клетку также можно приводить в контакт *in vitro* с иРНК, а затем трансплантировать субъекту.

В некоторых вариантах осуществления приведение клетки в контакт с иРНК включает «введение» или «доставку иРНК в клетку» путем облегчения или осуществления захвата или поглощения клеткой. Поглощение или захват иРНК может происходить посредством диффузии без посторонней помощи или активных клеточных процессов, или с помощью вспомогательных агентов или устройств. Введение иРНК в клетку может осуществляться *in vitro* или *in vivo*. Например, для введения *in vivo* иРНК можно

инъектировать в участок ткани или вводить системно. Введение *in vitro* в клетку включает способы, известные в данной области техники, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны ниже или известны в данной области техники.

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

Как используется в настоящем документе термин «субъект» представляет собой животное, такое как млекопитающее, включая примата (такого как, человек, примат, отличный от человека, например, обезьяна и шимпанзе), не являющееся приматом животное (такое как, корова, свинья, лошадь, коза, кролик, овца, хомяк, морская свинка, кошка, собака, крыса или мышь) или птица, которая экспрессирует целевой ген либо эндогенно, либо гетерологично. В одном варианте осуществления субъект представляет собой человека, например, человека, у которого проводят лечение или оценку заболевания или расстройства, при котором является полезным снижение экспрессии АРОС3; человек, имеющий риск заболевания или расстройства, при котором является полезным снижение экспрессии АРОС3; человек, страдающий заболеванием или расстройством, при котором является полезным снижение экспрессии АРОС3; или человек, которого лечат от заболевания или расстройства, при котором является полезным снижение экспрессии АРОС3, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления субъектом является субъект женского пола. В других вариантах осуществления субъектом является субъект мужского пола. В одном варианте осуществления субъект является взрослым субъектом. В другом варианте осуществления субъектом является субъект детского возраста.

Используемые в настоящем документе термины «лечение» или «терапия» относятся к благоприятному или желаемому результату, такому как облегчение по меньшей мере одного признака или симптома расстройства, ассоциированного с АРОС3, у субъекта. Лечение также включает ослабление одного или нескольких признаков или симптомов, связанных с нежелательной экспрессией АРОС3; уменьшение степени нежелательной активации или стабилизации АРОС3; улучшение или смягчение нежелательной активации или стабилизации АРОС3. «Лечение» также может означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения. Термин «снижение» в контексте уровня АРОС3 у субъекта или маркера или симптома заболевания относится к статистически значимому снижению такого уровня. Снижение может представлять собой, например, снижение по меньшей мере на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более. В некоторых вариантах осуществления снижение составляет по меньшей мере 20%. В некоторых вариантах осуществления снижение составляет по меньшей мере 50% маркера заболевания, например

уровня экспрессии белка или гена. «Снижение» в контексте уровня АРОС3 у субъекта составляет предпочтительно ниже уровня, принятого в пределах диапазона нормы для индивидуума без такого расстройства. В некоторых вариантах осуществления «снижение» представляет собой уменьшение разницы между уровнем маркера или симптома для субъекта, страдающего заболеванием, и уровнем, принятым в пределах нормы для индивидуума, например, уровень снижения массы тела между индивидуумом, страдающим ожирением, и индивидуумом, масса которого принята в пределах нормы.

Используемый в настоящем документе термин «профилактика» или «предупреждение», когда его используют в отношении к заболеванию, расстройству или состоянию, которое можно лечить или облегчить путем снижения экспрессии гена АРОС3, относится к уменьшению вероятности того, что субъекта разовьется симптом, ассоциированный с таким заболеванием, расстройством или состоянием, например, симптом нежелательной или чрезмерной экспрессии АРОС3, такой как гипертриглицеридемия. Вероятность развития, например, гипертриглицеридемии снижается, например, когда у индивидуума, имеющего один или несколько факторов риска гипертриглицеридемии, либо не развивается гипертриглицеридемия, либо гипертриглицеридемия развивается с меньшей степенью тяжести по сравнению с популяцией, которая имеет те же факторы риска и в которой не проводили лечение, как описано в настоящем документе. Отсутствие развития заболевания, расстройства или состояния или снижение развития симптома, связанного с таким заболеванием, расстройством или состоянием (например, по меньшей мере примерно на 10% по клинически принятой шкале для этого заболевания или расстройства), или замедленное проявление симптомов (например, на дни, недели, месяцы или годы) считается эффективной профилактикой.

Используемый в настоящем документе термин «заболевание, ассоциированное с апополипротеином С3» или «АРОС3-ассоциированное заболевание» представляет собой заболевание, расстройство или состояние, которое вызвано или связано с нежелательной или чрезмерной экспрессией АРОС3. Термин «АРОС3-ассоциированное заболевание» включает заболевание, расстройство или состояние, которое можно лечить или облегчить путем снижения экспрессии АРОС3. Термин «АРОС3-ассоциированное заболевание» включает гипертриглицеридемию или высокий уровень триглицеридов.

Уровни триглицеридов в сыворотке субъекта, например, субъекта-человека, которые могут быть свойственны гипертриглицеридемии, описаны в Oh, R. C. *et al.*, (2007) *American Family Physician*, 75(9):1366-1371. В частности, гипертриглицеридемия может быть связана с «погранично-высоким уровнем триглицеридов в сыворотке» (т.е. 150-199 мг на дл или 1,70-2,25 ммоль на л); «высоким уровнем триглицеридов в сыворотке» (т.е. 200-499 мг на дл или 2,26-5,64 ммоль на л); или «очень высоким уровнем триглицеридов» (т.е. 500 мг на дл или выше (или 5,65 ммоль на л или выше)

В одном варианте осуществления АРОС3-ассоциированное заболевание представляет собой первичную гипертриглицеридемию. «Первичная триглицеридемия»

возникает вследствие экологических или генетических причин (например, в результате отсутствия очевидной основной медицинской причины). Типичные заболевания, характеризующиеся как первичные гипертриглицеридемии, включают, но не ограничиваются ими, семейную хиломикронемию (гиперлипопротеинемия типа I), первичную смешанную гиперлипидемию (тип 5), семейную гипертриглицеридемию (гиперлипопротеинемия типа 4), семейную комбинированную гиперлипопротеинемию (тип 2В) и семейную дисбеталипопротеинемию (гиперлипопротеинемия типа 3).

В другом варианте осуществления АРОС3-ассоциированное заболевание представляет собой вторичную гипертриглицеридемию. "Вторичная триглицеридемия" вызвана или связана с другими основными расстройствами и состояниями. Такие расстройства и/или состояния включают, например, ожирение, метаболический синдром, диабет, жировую дегенерацию печени, употребление алкоголя, заболевание почек, беременность, неалкогольную жировую болезнь печени, гипотиреоз, парапротеинемии (такие как гипергаммаглобулинемия при макроглобулинемии, миелома, лимфома и лимфолейкозы), аутоиммунные заболевания (такие как системная красная волчанка), прием лекарственных препаратов (таких как антиретровирусные препараты, включая ритонавир и лопинавир, и антипсихотические препараты, включая клозапин и оланзапин), см. G. Yuan *et al.*, (2007) *Canadian Medical Association Journal*, 176(8):1113-1120.

Любое расстройство, которое может быть причиной гипертриглицеридемии (например, вторичной гипертриглицеридемии) или которое может быть следствием гипертриглицеридемии (например, первичной или вторичной гипертриглицеридемии), охватывается термином «АРОС3-ассоциированное заболевание». Неограничивающие примеры АРОС3-ассоциированных заболеваний включают метаболические нарушения, например, неалкогольная жировая болезнь печени, неалкогольный стеатогепатит, синдром поликистозных яичников, заболевание почек, ожирение, сахарный диабет 2 типа (инсулинорезистентность); гипертензия; сердечно-сосудистые заболевания, например, атеросклероз; и панкреатит, например, острый панкреатит.

«Терапевтически эффективное количество», как используется в настоящем документе, включает количество агента РНКи, которое при введении субъекту, страдающему АРОС3-ассоциированным заболеванием, является достаточным для эффективного лечения заболевания (например, за счет уменьшения, облегчения или поддержания существующего заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания). «Терапевтически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от агента РНКи, способа введения агента, заболевания и его тяжести, и анамнеза заболевания, возраста, массы, семейного анамнеза, генетической характеристики, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей субъекта, который подлежит лечению.

«Профилактически эффективное количество», как используется в настоящем документе, включает количество агента РНКи, которое при введении субъекту, имеющему АРОС3-ассоциированное заболевание, является достаточным для предотвращения или

облегчения заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания. Облегчение заболевания включает замедление течения заболевания или уменьшение тяжести развивающегося позднее заболевания. «Профилактически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от агента РНКи, способа введения агента, степени риска заболевания и анамнеза заболевания, возраста, массы, семейного анамнеза, генетической характеристики, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, который подлежит лечению.

«Терапевтически эффективное количество» или «профилактически эффективное количество» также включает количество агента РНКи, которое оказывает желаемый эффект при разумном соотношении польза/риск, принятом по отношению к такому лечению. иРНК, используемая в способах по настоящему изобретению, может быть введена в количестве, достаточном для получения разумного соотношения польза/риск, принятого по отношению к такому лечению.

Фраза «фармацевтически приемлемый» используется в настоящем документе для обозначения таких соединений, веществ, композиций или лекарственных форм, которые, в рамках здравого медицинского суждения, пригодны для использования в контакте с тканями человека и животных без проявления чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерных с разумным соотношением польза/риск.

Фраза «фармацевтически приемлемый носитель», используемая в настоящем документе, означает фармацевтически приемлемое вещество, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент, технологическую добавку (например, скользящее вещество, тальк, стеарат магния, кальция или цинка, или стериновая кислота), или материал для инкапсулирования растворителя, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения из одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в том смысле, что он совместим с другими ингредиентами лекарственной формы и не быть вредным для субъекта, подлежащего лечению. Такие носители известны в данной области техники. Фармацевтически приемлемые носители включают носители для введения путем инъекции.

Термин «образец», используемый в настоящем документе, включает совокупность сходных жидкостей, клеток или тканей, выделенных у субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку и серозные жидкости, плазму, спинномозговую жидкость, глазные жидкости, лимфу, мочу, слюну и тому подобное. Образцы тканей могут включать образцы из тканей, органов или локализованных областей. Например, образцы могут быть получены из определенных органов, частей органов или жидкостей или клеток внутри этих органов. В некоторых вариантах осуществления образцы могут быть получены из печени (например, целая печень или определенные сегменты печени или определенные типы клеток в печени, такие как, например, гепатоциты). В некоторых вариантах осуществления

«образец, полученный от субъекта» относится к моче, полученной от субъекта. «Образец, полученный от субъекта» может относиться к крови или полученной из крови сыворотке или плазме субъекта.

## II. иРНК по изобретению

Настоящее изобретение предоставляет иРНК, которые ингибируют экспрессию гена аполипопротеина С3. В предпочтительных вариантах осуществления иРНК включает молекулы двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии гена АРОС3 в клетке, такой как клетка внутри субъекта, например млекопитающего, такого как человек, восприимчивого к развитию аполипопротеин С3-ассоциированного расстройства, например, гипертриглицеридемии. Агент дцРНК включает антисмысловую цепь, имеющую область комплементарности, которая комплементарна по меньшей мере части мРНК, образованной при экспрессии гена АРОС3. Область комплементарности имеет длину около 19-30 нуклеотидов (например, около 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20 или 19 нуклеотидов в длину). При контакте с клеткой, экспрессирующей ген АРОС3, иРНК ингибирует экспрессию гена АРОС3 (например, ген АРОС3 человека, примата, не являющегося приматом животного или крысы) по меньшей мере примерно на 50%, как определено, например, с помощью ПЦР или способа на основе разветвленной ДНК (bDNA), или способа на основе белков, такого как иммунофлуоресцентный анализ, с использованием, например, методов вестерн-блоттинга или проточной цитометрии. В предпочтительных вариантах осуществления ингибирование экспрессии определяют с помощью метода количественной ПЦР, представленного в примерах в настоящем документе, с миРНК, например, в концентрации 10 нМ, в соответствующей клеточной линии организма, представленной в настоящем документе. В предпочтительных вариантах осуществления ингибирование экспрессии *in vivo* определяется нокдауном человеческого гена у грызунов, экспрессирующих человеческий ген, например, у мыши или AAV-инфицированной мыши, экспрессирующей человеческий ген-мишень, например, при введении в виде однократной дозы, например, 3 мг/кг при надире экспрессии РНК.

ДцРНК включает две цепи РНК, которые комплементарны и гибридизуются с образованием дуплексной структуры при условиях, в которых будет применяться дцРНК. Одна цепь дцРНК (антисмысловая цепь) включает область комплементарности, которая по существу комплементарна и, как правило, полностью комплементарна последовательности-мишени. Последовательность-мишень можно получить из последовательности мРНК, образованной во время экспрессии гена АРОС3. Другая цепь (смысловая цепь) включает область, комплементарную антисмысловой цепи, таким образом, что две цепи гибридизуются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. Как описано в другом месте настоящего документа и как известно в данной области, комплементарные последовательности дцРНК также могут содержаться в виде самокомплементарных областей одной молекулы нуклеиновой кислоты, а не располагаться на отдельных олигонуклеотидах.

Обычно длина дуплексной структуры составляет от 15 до 30 пар оснований, например, длина составляет 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, или 21-22 пар оснований. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления длина дуплексной структуры составляет от 18 до 25 пар оснований, например, длина составляет 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-25, 21-24, 21-23, 21-22, 22-25, 22-24, 22-23, 23-25, 23-24 или 24-25 пар оснований, например, длина составляет 19-21 пар оснований. Также подразумевают, что диапазоны и длины, промежуточные по отношению к указанным выше диапазонам и длинам, являются частью настоящего изобретения.

Аналогично, длина области комплементарности с последовательностью-мишенью составляет от 15 до 30 нуклеотидов, например, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, или 21-22 нуклеотидов, например, 19-23 нуклеотидов или 21-23 нуклеотидов. Также подразумевают, что диапазоны и длины, промежуточные по отношению к указанным выше диапазонам и длинам, являются частью настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления длина дуплексной структуры составляет от 19 до 30 пар оснований. Как правило, длина области комплементарности с последовательностью-мишенью составляет от 19 до 30 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления длина дцРНК составляет от примерно 19 до примерно 23 нуклеотидов или от примерно 25 до примерно 30 нуклеотидов. В целом дцРНК является достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для фермента Dicer. Например, в данной области хорошо известно, что дцРНК длиной более 21-23 нуклеотидов могут служить в качестве субстратов для Dicer. Обычному специалисту также понятно, что область РНК, нацеленная на расщепление, наиболее часто является частью более крупной молекулы РНК, часто молекулы мРНК. Когда это приемлемо, "часть" мРНК-мишени представляет собой непрерывную последовательность мРНК-мишени достаточной длины, чтобы позволить ей быть субстратом для контролируемого РНК-и расщепления (т.е. расщепление через каскад RISC).

Специалисту в данной области также будет понятно, что основной функциональной частью дцРНК является дуплексная область, например, дуплексная область из примерно от 19 до 30 пар оснований, например, из примерно 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пар оснований. Таким образом, в одном варианте осуществления, при условии процессирования в

функциональный дуплекс, например, из 15-30 пар оснований, который нацеливает желаемую РНК на расщепление, молекула РНК или комплекс молекул РНК, имеющих дуплексную область более 30 пар оснований, представляет собой дцРНК. Таким образом, специалисту в данной области будет понятно, что в одном варианте осуществления микроРНК представляет собой дцРНК. В другом варианте осуществления дцРНК не является встречающейся в природе микроРНК. В другом варианте осуществления агент иРНК, пригодный для нацеливания на экспрессию гена апополипротеина С3, не образуется в клетке-мишени путем расщепления более крупной дцРНК.

дцРНК, как описано в настоящем описании, может дополнительно включать один или несколько одноцепочечных нуклеотидных выступающих концов, например, из 1-4, 2-4, 1-3, 2-3, 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов. дцРНК, имеющие по меньшей мере один нуклеотидный выступающий конец, могут иметь неожиданно более высокие ингибиторные свойства относительно их аналогов с тупыми концами. Нуклеотидный выступающий конец может содержать или состоять из нуклеотидного/нуклеозидного аналога, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Выступающий конец(концы) может находиться на смысловой цепи, антисмысловой цепи или на любой их комбинации. Более того, нуклеотид(ы) выступающего конца может находиться на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах антисмысловой или смысловой цепи дцРНК.

дцРНК можно синтезировать стандартными способами, известными в данной области. Соединения двухцепочечной РНК по изобретению могут быть получены с использованием двухстадийной процедуры. Сначала, отдельные цепи двухцепочечной молекулы РНК получают по отдельности. Затем составляющие цепи подвергают отжигу. Индивидуальные цепи соединения мРНК можно получать с использованием органического синтеза в жидкой фазе или в твердой фазе, или обоих из них. Органический синтез обеспечивает преимущество, состоящее в том, что можно без труда получать олигонуклеотидные цепи, содержащие неприродные или модифицированные нуклеотиды. Подобным образом, одноцепочечные олигонуклеотиды по изобретению можно получать с использованием органического синтеза в жидкой фазе или в твердой фазе или обоих из них.

В одном аспекте дцРНК по изобретению включает по меньшей мере две нуклеотидные последовательности: смысловую последовательность и антисмысловую последовательность. Смысловая цепь выбрана из группы последовательностей, предоставленных в любой из таблиц 2-5, 14 и 15, и соответствующая антисмысловая цепь для смысловой цепи выбрана из группы последовательностей любой из таблиц 2-5, 14 и 15. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, причем одна из последовательностей по существу комплементарна последовательности мРНК, полученной при экспрессии гена апополипротеина С3. По существу, в этом аспекте дцРНК включает два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описан как смысловая цепь в любой из таблиц 2-5, 14 и 15, а второй олигонуклеотид описан как соответствующая антисмысловая цепь для смысловой цепи в любой из таблиц 2-5, 14 и 15.

В некоторых вариантах осуществления по существу комплементарные последовательности дцРНК находятся на отдельных олигонуклеотидах. В других вариантах осуществления по существу комплементарные последовательности дцРНК находятся на одном олигонуклеотиде.

В некоторых вариантах осуществления смысловая или антисмысловая цепь выбрана из смысловой или антисмысловой цепи любого из дуплексов AD-959917.1; AD-959918.1; AD-960096.1; AD-960064.1; AD-959914.1; AD-959941.1; AD-960031.1; AD-960063.1; AD-960293.1; AD-960288.1; AD-960445.1; AD-960292.1; AD-960475.1; AD-960442.1; AD-960470.1; AD-960436.1; AD-960446.1; AD-960474.1; AD-960294.1; AD-960471.1; AD-960314.1; AD-960443.1; AD-960282.1; AD-960283.1; AD-80794.7; AD-960478.1; AD-960481.1; или AD-960482.1.

В других вариантах осуществления смысловая или антисмысловая цепь выбрана из смысловой или антисмысловой цепи любого из дуплексов AD-959917.1; AD-960064.1; AD-960031.1; AD-960063.1; AD-960293.1; AD-960288.1; AD-960445.1; AD-960292.1; AD-960475.1; AD-960442.1; AD-960470.1; AD-960436.1; AD-960446.1; AD-960474.1; AD-960294.1; AD-960443.1; AD-80794.7; и AD-959910.1.

В некоторых вариантах осуществления смысловая или антисмысловая цепь выбрана из смысловой или антисмысловой цепи любого из дуплексов AD-80794.8; AD-959907.2; AD-959914.2; AD-959916.2; AD-959932.2; AD-960314.2; AD-959941.2; AD-960030.2; AD-960062.2; AD-960064.2; AD-960065.2; AD-960066.2; AD-960294.2; AD-960471.2; AD-960474.2; AD-960478.2; и AD-960481.2.

В некоторых вариантах осуществления смысловая или антисмысловая цепь выбрана из смысловой или антисмысловой цепи любого из дуплексов AD-960030; AD-1143243; AD-1143245; AD-1143247; AD-1143249; AD-1143256; AD-1143260; AD-1143278; AD-1143287; AD-1143295; AD-1143299; AD-1143302; и AD-1143305.

В некоторых вариантах осуществления смысловая или антисмысловая цепь выбрана из смысловой или антисмысловой цепи дуплекса AD-1143243.

Следует понимать, что хотя последовательности в таблицах 2, 4 и 14 не описаны как модифицированные или конъюгированные последовательности, РНК в иРНК по изобретению, например, дцРНК по изобретению, может содержать любую из последовательностей, указанных в любой из таблиц 2-5, 14 и 15, которая является немодифицированной, неконъюгированной или модифицированной или конъюгированной иначе, чем описано в них. Другими словами, изобретение охватывает дцРНК из таблиц 2-5, 14 и 15, которые являются немодифицированными, неконъюгированными, модифицированными или конъюгированными, как описано в настоящем документе.

Квалифицированному специалисту хорошо известно, что дцРНК, имеющие дуплексную структуру из примерно от 20 до 23 пар оснований, например, из 21 пары оснований, были признаны особенно эффективными в отношении индукции РНК-интерференции (Elbashir *et al.*, *EMBO* 2001, 20:6877-6888). Однако другие исследователи обнаружили, что более короткие или более длинные дуплексные структуры РНК также

могут быть эффективными (Chu and Rana (2007) *RNA* 14:1714-1719; Kim *et al.* (2005) *Nat Biotech* 23:222-226). В вариантах осуществления, описанных выше, вследствие природы олигонуклеотидных последовательностей, предоставленных в любой из таблиц 2-5, 14 и 15, дцРНК, как описано в настоящем описании, могут включать по меньшей мере одну цепь длиной минимум 21 нуклеотид. Можно обоснованно ожидать, что более короткие дуплексы, имеющие одну из последовательностей любой из таблиц 2-5, 14 и 15 минус только несколько нуклеотидов на одном или обоих концах, аналогично могут быть эффективными по сравнению с дцРНК, как описано выше. Таким образом, дцРНК, имеющие последовательность из по меньшей мере 19, 20 или более смежных нуклеотидов, происходящих из любой из последовательностей любой из таблиц 32-5, 14 и 15, и отличающиеся по своей способности ингибировать экспрессию гена аполипопротеина С3 не более чем на примерно 5, 10, 15, 20, 25 или 30% относительно дцРНК, содержащей полную последовательность, считаются входящими в объем настоящего изобретения.

Кроме того, РНК, представленные в таблицах 2-5, 14 и 15, идентифицируют участок(участки) в транскрипте аполипопротеина С3, который является чувствительным к опосредуемому RISC расщеплению. По существу, настоящее изобретение, кроме того, относится к иРНК, которые нацелены на один из этих участков. Как используется в настоящем документе, иРНК называют нацеливающейся на конкретный участок РНК-транскрипта, если и-РНК стимулирует расщепление транскрипта где-либо в конкретном участке. Такая и-РНК, как правило, включает по меньшей мере примерно 19 смежных нуклеотидов из одной из последовательностей, предоставленных в любой из таблиц 2-5, 14 и 15, связанной с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из области, соседней с выбранной последовательностью в гене аполипопротеина С3.

### III. Модифицированные иРНК по изобретению

В некоторых вариантах осуществления РНК в иРНК по изобретению, например, дцРНК, является немодифицированной и не содержит, например, химических модификаций или конъюгаций, известных в данной области и описанных в настоящем описании. В других вариантах осуществления РНК в иРНК по изобретению, например, дцРНК, является химически модифицированной для повышения стабильности или других благоприятных характеристик. В некоторых вариантах осуществления изобретения по существу все нуклеотиды иРНК по изобретению являются модифицированными. В других вариантах осуществления изобретения все нуклеотиды иРНК или по существу все нуклеотиды иРНК являются модифицированными, т.е. в цепи иРНК присутствует не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированных нуклеотидов.

Нуклеиновые кислоты, представленные в изобретении, можно синтезировать или модифицировать способами, общеизвестными в данной области, такими как способы, описанные в "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. *et al.* (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки. Модификации включают, например, концевые модификации, например, 5'-концевые модификации (фосфорилирование, конъюгация, инвертированные связи) или 3'-

концевые модификации (конъюгация, нуклеотиды ДНК, инвертированные связи и т.д.); модификации оснований, например, замена стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые образуют пары с расширенным репертуаром партнеров, удаление оснований (нуклеотиды с удаленным азотистым основанием) или конъюгированные основания; модификации сахаров (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замену сахара; или модификации основной цепи, включая модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры соединений иРНК, пригодных в вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, РНК, содержащие модифицированные остовы или не содержащие природных межнуклеозидных связей. РНК, обладающие модифицированными остовами, включают, среди прочих, РНК, которые не имеют атома фосфора в остове. Для целей настоящего описания, и, как иногда упоминается в данной области, модифицированные РНК, которые не содержат атома фосфора в их межнуклеозидном остове, также можно считать олигонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления модифицированные иРНК имеют атом фосфора в их межнуклеозидном остове.

Модифицированные остовы РНК включают, например, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тиоалкилфосфонаты, тиоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5'-связи, их аналоги с 2'-5'-связями и аналоги, имеющие инвертированную полярность, где соседние пары нуклеозидных звеньев соединены в направлении от 3'-5' к 5'-3' или от 2'-5' к 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты дцРНК по изобретению находятся в форме свободной кислоты. В других вариантах осуществления изобретения, агенты дцРНК по изобретению находятся в форме соли. В одном варианте осуществления агенты дцРНК по изобретению находятся в форме натриевой соли. В некоторых вариантах осуществления, когда агенты дцРНК по изобретению находятся в форме натриевой соли, ионы натрия присутствуют в агенте в качестве противоионов по существу для всех фосфодиэфирных и/или фосфоротиотатных групп, присутствующих в агенте. Агенты, в которых по существу все фосфодиэфирные и/или фосфоротиотатные связи имеют противоион натрия, включают не более 5, 4, 3, 2 или 1 фосфодиэфирной и/или фосфоротиотатной связи без противоиона натрия. В некоторых вариантах осуществления, когда агенты дцРНК по изобретению находятся в форме натриевой соли, ионы натрия присутствуют в агенте в качестве противоионов для всех фосфодиэфирных и/или фосфоротиотатных групп, присутствующих в агенте.

Репрезентативные патенты США, в которых описано получение описанных выше фосфорсодержащих связей, включают, но не ограничиваются ими, патенты США No.

3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177195; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541316; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361; 5625050; 6028188; 6124445; 6160109; 6169170; 6172209; 6239265; 6277603; 6326199; 6346614; 6444423; 6531590; 6534639; 6608035; 6683167; 6858715; 6867294; 6878805; 7015315; 7041816; 7273933; 7321029; и патент США RE39464, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Модифицированные остовы РНК, которые не включают атом фосфора, имеют остовы, которые образованы короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомами и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, или одной или несколькими короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. Они включают остовы, имеющие морфолиновые связи (частично образованные из сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; ацетильные и тиоацетильные остовы; метиленацетильные и тиоацетильные остовы; алкенсодержащие остовы; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленигидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы и другие остовы, имеющие смешанные составные части N, O, S и CH<sub>2</sub>.

Репрезентативные патенты США, в которых описано получение описанных выше олигонуклеозидов, включают, но не ограничиваются ими, патенты США No. 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 564562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677; 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5608046; 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437; и 5677439, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Предполагается, что подходящие миметики РНК можно использовать в иРНК, представленных в настоящем документе, в которых как сахар, так и межнуклеозидная связь, т.е. остов, нуклеотидных звеньев заменены новыми группами. Элементы оснований сохраняются для гибридизации с соответствующим целевым соединением нуклеиновой кислоты. Одно такое олигомерное соединение, в котором миметик РНК, который, как было показано, обладает превосходными свойствами гибридизации, называют пептидной нуклеиновой кислотой (PNA). В соединениях PNA остов сахара в РНК заменен амидсодержащим остовом, в частности, аминоэтилглициновым остовом. Нуклеосахариды сохранены и связываются непосредственно или опосредованно с атомами азота азогруппы амидной части остова. Репрезентативные патенты США, в которых описано получение соединений PNA, включают, но не ограничиваются ими, патенты США No. 5539082; 5714331; и 5719262, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Дополнительные соединения PNA, пригодные для применения в иРНК по изобретению, описаны, например, в Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления, представленные в изобретении, включают РНК с фосфоротиоатными остовами и олигонуклеозиды с гетероатомными остовами, и, в частности,  $--CH_2--NH--CH_2-$ ,  $--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2-$  [известный как остов метилен(метилимину) или ММІ],  $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2-$ ,  $--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2-$  и  $--N(CH_3)--CH_2--CH_2-$  [где нативный фосфодиэфирный остов представлен как  $--O--P--O--CH_2-$ ] описанного выше патента США No. 5489677, и амидные остовы описанного выше патента США No. 5602240. В некоторых вариантах осуществления РНК, представленные в настоящем документе, имеют структуры морфолинового остова упомянутого выше патента США No. 5034506.

Модифицированные РНК также могут содержать одну или несколько замещенных цепей сахаров. иРНК, например, дцРНК, представленные в настоящем документе, могут включать одно из следующего в 2'-положении: OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил; или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут представлять собой замещенный или незамещенный C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub> алкил или C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> алкенил и алкинил. Иллюстративные пригодные модификации включают O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub> и O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, где n и m имеют значение от 1 до примерно 10. В других вариантах осуществления дцРНК включают одно из следующих в 2'-положении: низший C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминокламино, полиалкиламино, замещенный силлил, уходящая группа РНК, репортерная группа, интеркалятор, группа для улучшения фармакокинетических свойств иРНК, или группа для улучшения фармакодинамических свойств иРНК, и другие заместители, имеющие сходные свойства. В некоторых вариантах осуществления модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O--CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), т.е. группу алкокси-алкокси. Другой иллюстративной модификацией является 2'-диметиламинооксиэтокси, т.е. группа O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, также известная как 2'-DMAOE, как описано в примерах в настоящем документе ниже, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известный в данной области как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), *т.е.*, 2'-O--CH<sub>2</sub>--O--CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>. Дополнительные иллюстративные модификации включают: 5'-Me-2'-F нуклеотиды, 5'-Me-2'-OMe нуклеотиды, 5'-Me-2'-дезоксинуклеотиды (оба R- и S-изомеры в этих трех семействах); 2'-алкоксиалкил; и 2'-NMA (N-метилацетамид).

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH<sub>3</sub>), 2'-аминопропокси (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) и 2'-фтор (2'-F). Подобные модификации также могут быть осуществлены в других положениях в РНК иРНК, в частности в 3'-положении сахара на 3'-концевом нуклеотиде или в 2'-5'-связанных дцРНК и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. иРНК также могут иметь миметики сахаров, такие как циклобутильные части, вместо пентафуранозильного сахара. Репрезентативные патенты США, в которых описано

получение таких модифицированных структур сахаров, включают, но не ограничиваются ими, патенты США No. 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5,646,265; 5658873; 5670633; и 5700920, некоторые из которых находятся в совместном владении с настоящей заявкой. Полное содержание каждого из указанных выше патентов включено в настоящее описание в качестве ссылки.

иРНК также могут включать модификации или замены нуклеоснований (часто в данной области просто обозначаемых как "основания"). Как используют в настоящем описании, "немодифицированные" или "природные" нуклеоснования включают пуриновые основания аденин (A) и гуанин (G), и пиримидиновые основания тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные нуклеоснования включают другие синтетические и природные нуклеоснования, такие как дезокситимин (dT), 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропильные 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-галоген, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген, в частности 5-бром, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-дезааденин и 3-деазагуанин и 3-дезааденин. Следующие нуклеоснования включают основания, описанные в патенте США No. 3687808, основания, описанные в *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; основания, описанные в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, pages 858-859, Kroschwitz, J. L., ed. John Wiley & Sons, 1990, основания, описанные *Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613, и основания, описанные *Sanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications*, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из этих нуклеоснований являются особенно пригодными для повышения аффинности связывания олигомерных соединений по изобретению. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6-замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что 5-метилцитозиновые замещения повышают стабильность дуплекса нуклеиновых кислот на 0,6-1,2°C (*Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278*) и они являются иллюстративными заменами оснований, еще более конкретно, когда они комбинированы с 2'-O-метоксиэтильными модификациями сахаров.

Репрезентативные патенты США, в которых описано получение некоторых из описанных выше модифицированных нуклеоснований, а также других модифицированных нуклеоснований, включают, но не ограничиваются ими, упомянутые выше патенты США No. 3687808, 4845205; 513030; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121, 5596091;

5614617; 5681941; 5750692; 6015886; 6147200; 6166197; 6,222025; 6235887; 6380368; 6528640; 6639062; 6617438; 7045610; 7427672; и 7495088, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

РНК в иРНК также могут быть модифицированы включением одной или нескольких замкнутых нуклеиновых кислот (LNA). Замкнутая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, имеющий модифицированную часть рибозы, где часть рибозы содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-атомы углерода. Эта структура эффективно "замыкает" рибозу в структурной конформации 3'-эндо. Было показано, что добавление замкнутых нуклеиновых кислот к миРНК увеличивает стабильность миРНК в сыворотке и уменьшает нецелевые эффекты (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193).

В некоторых вариантах осуществления РНК иRNA также может быть модифицирована для включения одного или нескольких бициклических сахарных фрагментов. «Бициклический сахар» представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное посредством связывания мостиком двух атомов. «Бициклический нуклеозид» ("BNA") представляет собой нуклеозид с сахарным фрагментом, включающий мостик, соединяющий два атома углерода сахарного кольца, образуя таким образом бициклическую кольцевую систему. В некоторых вариантах осуществления мостик соединяет 4'-углерод и 2'-углерод в сахарном кольце. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления агент по изобретению может включать одну или несколько замкнутых нуклеиновых кислот (LNA). Замкнутая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, имеющий модифицированный рибозный фрагмент, где рибозный фрагмент содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-атомы углерода. Другими словами, LNA представляет собой нуклеотид, содержащий бициклического сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'. Эта структура эффективно «замыкает» рибозу в структурной конформации 3'-эндо. Было показано, что добавление замкнутых нуклеиновых кислот к миРНК увеличивает стабильность миРНК в сыворотке и уменьшает нецелевые эффекты (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). Примеры бициклических нуклеозидов для использования в полинуклеотидах по изобретению включают, без ограничения, нуклеозиды, содержащие мостик между 4'- и 2'-атомами рибозильного кольца. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотидные агенты по изобретению включают один или несколько бициклических нуклеозидов, содержащих мостик 4'-2'. Примеры таких бициклических нуклеозидов, соединенных мостиком 4'-2', включают, но не ограничиваются ими 4'-(CH<sub>2</sub>)-O-2' (LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)-S-2'; 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2' (ENA); 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2' (также упоминается как «затрудненный этил» или "сEt") и 4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2' (и их аналоги; см., например, патент США No. 7399845); 4'-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)-O-2' (и их аналоги; см., например, патент США No. 8278283); 4'-CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2' (и их аналоги; см., например, патент США No. 8278425);

4'-CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-2' (см., например, публикацию патента США No. 2004/0171570); 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C1-C12 алкил, или защитную группу (см., например, патент США No. 7427672); 4'-CH<sub>2</sub>-C(H)(CH<sub>3</sub>)-2' (см., например, Chattopadhyaya *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); и 4'-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-2' (и их аналоги; см., например, патент США No. 8278426). Полное содержание каждого из вышеперечисленных включено в настоящее описание посредством ссылки.

Дополнительные репрезентативные патенты США и публикации патентов США, в которых описано получение нуклеотидов замкнутых нуклеиновых кислот, включают, но не ограничиваются ими, следующие: патент США No. 6268490; 6525191; 6670461; 6770748; 6794499; 6998484; 7053207; 7034133; 7084125; 7399845; 7427672; 7569686; 7741457; 8022193; 8030467; 8278425; 8278426; 8278283; US 2008/0039618; и US 2009/0012281, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Любой из указанных выше бициклических нуклеозидов можно получить с имеющим одну или несколько стереохимических конфигураций сахаров, включая, например, α-L-рибофуранозу и β-D-рибофуранозу (см. WO 99/14226).

РНК иРНК также может быть модифицирована для включения одного или нескольких затрудненных этилом нуклеотидов. Используемый в настоящем документе термин «затрудненный этилом нуклеотид» или «сEt» представляет собой замкнутую нуклеиновую кислоту, содержащую бициклический сахарный фрагмент, включающий мостик 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2'. В одном варианте осуществления затрудненный этилом нуклеотид находится в S-конформации, обозначаемой в настоящем документе как “S-cEt.”

иРНК по изобретению может также включать один или несколько «конформационно ограниченных нуклеотидов» («CRN»). CRN представляют собой аналоги нуклеотидов с линкером, соединяющим C2'- и C4'- атомы углерода рибозы или C3- и -C5' атомы углерода рибозы. CRN запирает рибозное кольцо в стабильную конформацию и увеличивает аффинность гибридизации к мРНК. Линкер имеет достаточную длину для помещения атома кислорода в оптимальное положение для стабилизации и аффинности, что приводит к меньшему “сморщиванию” рибозного кольца.

Репрезентативные публикации, в которых изложена идея получения некоторых из указанных выше CRN, включают, но не ограничиваются этим, публикацию патента США No. 2013/0190383; и публикацию PCT WO 2013/036868, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления иРНК по изобретению содержит один или несколько мономеров, которые представляют собой нуклеотиды UNA (незапертая нуклеиновая кислота). UNA представляет собой незапертую ациклическую нуклеиновую кислоту, в которой любая из связей сахара была удалена, образуя незапертый «сахарный» остаток. В одном примере, UNA также включает мономер с удаленными связями между C1'-C4' (т.е. ковалентная связь углерод-кислород-углерод между C1'- и C4'-атомами углерода). В другом примере связь C2'-C3' (т.е. ковалентная углерод-углеродная связь между C2'- и C3'-атомами углерода) сахара была удалена (см. *Nuc. Acids Symp. Series*, 52,

133-134 (2008) and Fluiter *et al.*, *Mol. Biosyst.*, 2009, 10, 1039 hereby incorporated by reference).

Репрезентативные публикации США, в которых описано получение UNA, включают, но не ограничиваются ими, патент США No. 8314227; и публикации патента США No. 2013/0096289; 2013/0011922; и 2011/0313020, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

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

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

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

В некоторых аспектах изобретения двухцепочечные РНК-агенты по изобретению включают агенты с химическими модификациями, как описано, например, в WO2013/075035, полное содержание каждого из которых включено в настоящее описание посредством ссылки. В WO2013/075035 представлены мотивы трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов в смысловой цепи или антисмысловой цепи агента дцРНКи, в частности, в сайт расщепления или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь и антисмысловая цепь агента дцРНКи могут быть полностью модифицированы иным способом. Введение таких мотивов нарушает паттерн модификаций, если он присутствует, смысловой или антисмысловой нити. Агент дцРНКи может быть необязательно конъюгирован с лигандом, производным GalNAc, например, на смысловой цепи.

Более конкретно, когда смысловая цепь и антисмысловая цепь двухцепочечного РНК-агента полностью модифицированы так, что имеют один или несколько мотивов с тремя идентичными модификациями на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления по меньшей мере одной цепи агента дцРНКи или рядом с ним, наблюдалась активность сайленсинга генов агента дцРНКи.

Соответственно, изобретение обеспечивает двухцепочечные РНК-агенты, способные ингибировать экспрессию гена-мишени (т.е. гена APOC3) *in vivo*. Агент РНКи включает смысловую цепь и антисмысловую цепь. Длина каждой цепи агента РНКи может составлять, например, 17-30 нуклеотидов, 25-30 нуклеотидов, 27-30 нуклеотидов, 19-25 нуклеотидов, 19-23 нуклеотидов, 19-21 нуклеотидов, 21-25 нуклеотидов или 21-23 нуклеотидов.

Смысловая цепь и антисмысловая цепь обычно образуют двухцепочечный РНК-

дуплекс («дцРНК»), также называемый в настоящем документе «агент дцРНКи». Дуплексная область агента дцРНКи может составлять, например, длина дуплексной области может составлять 27-30 пар нуклеотидов, 19-25 пар нуклеотидов, 19-23 пар нуклеотидов, 19-21 пар нуклеотидов, 21-25 пар нуклеотидов или 21-23 пары нуклеотидов. В другом примере дуплексная область выбрана по длине из 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления агент дцРНКи может содержать один или несколько выступающих участков или копирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах одной или обеих цепей. Длина выступающего конца может составлять, независимо, 1-6 нуклеотидов, например, 2-6 нуклеотидов, 1-5 нуклеотидов, 2-5 нуклеотидов, 1-4 нуклеотида, 2-4 нуклеотида, 1-3 нуклеотида, 2-3 нуклеотида или 1-2 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления выступающие участки могут включать расширенные выступающие участки, как указано выше. Выступающие концы могут быть результатом того, что одна цепь длиннее другой, или результатом расположения двух цепей одинаковой длины со сдвигом. Выступающий конец может образовывать ошибочное спаривание с целевой мРНК, или он может быть комплементарным последовательностям-мишеням гена, или может иметь другую последовательность. Первая и вторая цепи также могут быть соединены, например, дополнительными основаниями с образованием шпильки или при помощи других линкеров, не содержащих основания.

В некоторых вариантах осуществления каждый из нуклеотидов в выступающей области агента дцРНКи может независимо представлять собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, включая, но не ограничиваясь этим, модифицированный 2'-сахар, такой как 2'-F, 2'-O-метил, тимидин (Т), 2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин (Тео), 2'-O-метоксиэтиладенозин (Аео), 2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин (m5Ceо) и любые их комбинации.

Например, ТТ может представлять собой последовательность выступающего конца на обоих концах каждой цепи. Выступающий конец может образовывать ошибочное спаривание с целевой мРНК, или он может быть комплементарным последовательности-мишени гена, или может иметь другую последовательность.

5'- или 3'-выступающие концы смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепей агента дцРНКи могут быть фосфорилированными. В некоторых вариантах осуществления выступающая(выступающие) область(области) содержит два нуклеотида, содержащих фосфоротиоат между двумя нуклеотидами, где два нуклеотида могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления выступающий конец присутствует на 3'-конце смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепях. В некоторых вариантах осуществления этот 3'-выступающий конец присутствует в антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления этот 3'-выступающий конец присутствует в смысловой цепи.

Агент дцРНКи может содержать только один выступающий конец, который может повышать интерферирующую активность РНКи, не влияя на его общую стабильность.

Например, одноцепочечный выступающий конец может быть расположен на 3'-конце смысловой цепи или, альтернативно, на 3'-конце антисмысловой цепи. РНКи также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой цепи (или на 3'-конце смысловой цепи) или *vice versa*. Как правило, антисмысловая цепь агента дцРНКи имеет нуклеотидный выступающий конец на 3'-конце, а 5'-конец является тупым. Не желая быть связанными теорией, асимметричный тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи и 3'-концевой выступающий конец антисмысловой нити способствуют включению направляющей цепи в процесс с участием RISC.

В некоторых вариантах осуществления агент дцРНКи имеет тупые оба конца, длина составляет 19 нуклеотидов, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 7, 8, 9 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В других вариантах осуществления агент дцРНКи имеет тупые оба конца, длина составляет 20 нуклеотидов, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 8, 9, 10 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В других вариантах осуществления, агент дцРНКи имеет тупые оба конца, длина составляет 21 нуклеотид, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В некоторых вариантах осуществления агент дцРНКи содержит смысловую цепь из 21 нуклеотида и антисмысловую цепь из 23 нуклеотидов, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца; антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца, где один конец агента РНКи тупой, а другой конец содержит выступающий конец из 2 нуклеотидов. Предпочтительно выступающий конец из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи.

Когда выступающий конец из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи, между тремя концевыми нуклеотидами могут быть две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, где два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид представляет собой спаренный нуклеотид, следующий за выступающим нуклеотидом. В одном варианте осуществления агент РНКи дополнительно имеет две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5'-конце смысловой цепи, так и на 5'-конце антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид в смысловой цепи и

антисмысловой цепи агента дцРНКи, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов, представляют собой модифицированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления каждый остаток независимо модифицирован 2'-О-метилом или 3'-фтором, например, в чередующемся мотиве. Необязательно, агент дцРНК дополнительно содержит лиганд (предпочтительно GalNAc<sub>3</sub>).

В некоторых вариантах осуществления средство дцРНКи содержит смысловую и антисмысловую цепь, где длина смысловой цепи составляет 25-30 нуклеотидных остатков, в которой начиная с 5'-концевого нуклеотида (положение 1) положения 1-23 первой цепи содержат по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; длина антисмысловой цепи составляет 36-66 нуклеотидных остатков и, начиная с 3'-концевого нуклеотида, содержит по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1-23 смысловой цепи с образованием дуплекса; где по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой цепи является неспаренным со смысловой цепью, и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов являются неспаренными со смысловой нитью, тем самым образуя 3'-одноцепочечный выступающий конец из 1-6 нуклеотидов; где 5'-конец антисмысловой нити содержит от 10 до 30 последовательных нуклеотидов, которые являются неспаренными со смысловой нитью, тем самым образуя 5'-одноцепочечный выступающий конец из 10-30 нуклеотидов; где по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой цепи являются спаренными основаниями с нуклеотидами антисмысловой цепи, когда смысловая и антисмысловая цепи выровнены для максимальной комплементарности, тем самым образуя по существу дуплексную область между смысловой и антисмысловой цепями; и антисмысловая цепь в достаточной степени комплементарна РНК-мишени на протяжении по меньшей мере 19 рибонуклеотидов антисмысловой цепи в длину для снижения экспрессию гена-мишени при введении двухцепочечной нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления или рядом с ним. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления или рядом с ним.

В некоторых вариантах осуществления агент дцРНКи содержит смысловую и антисмысловую цепи, где агент дцРНКи содержит первую цепь, длина которой составляет по меньшей мере 25 и не более 29 нуклеотидов, и вторую цепь, длина которой составляет не более 30 нуклеотидов с по меньшей мере одним мотивом из трех 2'-О-метил-модификации трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца; где 3'-конец первой цепи и 5'-конец второй цепи образуют тупой конец, а вторая цепь на 3'-конце длиннее на 1-4 нуклеотида, чем первая цепь, где длина дуплексного участка составляет по меньшей мере 25 нуклеотидов, и вторая цепь достаточно комплементарна мРНК-мишени на протяжении по меньшей мере 19 нуклеотидов длины второй цепи, для снижения экспрессии гена-мишени при введении агента РНКи в клетку млекопитающего, и где расщепление агента дцРНКи при помощи Dicer предпочтительно приводит к миРНК,

содержащей 3'-конец второй цепи, за счет чего обеспечивается снижение экспрессии гена-мишени у млекопитающего. Необязательно, агент дцРНКи дополнительно содержит лиганд.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь агента дцРНКи содержит по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь агента дцРНКи может также содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где один из мотивов находится в сайте расщепления или рядом с ним в антисмысловой цепи.

Для агента дцРНКи, имеющего дуплексную область длиной 19-23 нуклеотида, сайт расщепления антисмысловой цепи обычно находится в положениях 10, 11 и 12 от 5'-конца. Таким образом, мотивы трех идентичных модификаций могут находиться в 9, 10, 11 положениях; 10, 11, 12 положениях; 11, 12, 13 положениях; 12, 13, 14 положениях; или 13, 14, 15 положениях антисмысловой цепи, причем отсчет начинается с первого нуклеотида от 5'-конца антисмысловой нити, или отсчет начинается с первого спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца антисмысловой цепи. Сайт расщепления в антисмысловой цепи также может изменяться в соответствии с длины дуплексной области агента дцРНКи от 5'-конца.

Смысловая цепь агента дцРНКи может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления цепи; и антисмысловая цепь может иметь по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления цепи или рядом с ним. Когда смысловая цепь и антисмысловая цепь образуют дуплекс дцРНК, смысловая цепь и антисмысловая цепь могут быть выровнены таким образом, что один мотив из трех нуклеотидов на смысловой нити и один мотив из трех нуклеотидов на антисмысловой нити имеют перекрывание по меньшей мере в один нуклеотидов, т.е. по меньшей мере один из трех нуклеотидов мотива в смысловой цепи образует пару оснований по меньшей мере с одним из трех нуклеотидов мотива в антисмысловой цепи. Альтернативно, по меньшей мере два нуклеотида могут перекрываться, или все три нуклеотида могут перекрываться.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь агента дцРНКи может содержать более одного мотива трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах. Первый мотив может находиться в сайте расщепления цепи или рядом с ним, а другие мотивы могут представлять собой фланкирующую модификацию. Термин «фланкирующая модификация» в настоящем документе относится к мотиву, находящемуся на другом участке цепи, который отделен от мотива в сайте расщепления той же нити или рядом с ним. Фланкирующая модификация либо прилегает к первому мотиву, либо отделена по меньшей мере одним или несколькими нуклеотидами. Когда мотивы непосредственно прилегают друг к другу, тогда химическая структура мотивов отличается друг от друга, а когда мотивы разделены одним или несколькими нуклеотидами,

химические структуры могут быть одинаковыми или различными. Могут присутствовать две и более фланкирующие модификации. Например, если присутствуют две фланкирующие модификации, то каждая фланкирующая модификация может происходить на одном конце по отношению к первому мотиву, который находится в сайте расщепления или рядом с ним, или с обеих сторон основного мотива.

Подобно смысловой цепи, антисмысловая цепь агента дцРНКи может содержать более одного мотива с тремя идентичными модификациями на трех последовательных нуклеотидах, при этом по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления цепи или рядом с ним. Эта антисмысловая цепь может также содержать одну или несколько фланкирующих модификаций при выравнивании, подобных фланкирующим модификациям, которые могут присутствовать в смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления фланкирующая модификация в смысловой цепи или антисмысловой цепи агента дцРНКи обычно не включает первый один или первые два концевых нуклеотида на 3'-конце, на 5'-конце или на обоих концах цепи.

В других вариантах осуществления фланкирующая модификация в смысловой цепи или антисмысловой цепи агента дцРНКи обычно не включает первый один или первые два спаренных нуклеотида в дуплексной области на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах цепи.

Когда каждая из смысловой цепи и антисмысловой цепи агента дцРНКи содержат по меньшей мере одну фланкирующую модификацию, фланкирующие модификации могут попадать на один и тот же конец дуплексной области и иметь перекрытие в один, два или три нуклеотида.

Когда смысловая цепь и антисмысловая цепь агента дцРНКи содержат по меньшей мере две фланкирующие модификации, смысловая цепь и антисмысловая цепь могут быть выровнены так, что две модификации, каждая от одной цепи, попадают на один конец дуплексной области, с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации, каждая от одной цепи, попадают на другой конец дуплексной области с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации одной цепи попадают на каждую сторону основного мотива с перекрытием в один, два или три нуклеотида в дуплексной области.

В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи агента дцРНКи, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов, может быть модифицированным. Каждый нуклеотид может быть модифицирован одинаковой или разной модификацией, которые могут включать одно или несколько изменений одного или обоих несвязанных с фосфатом атомов кислорода или одного или нескольких связанных с фосфатом атомов кислорода; изменение компонента рибозного сахара, например, 2'-гидроксила в рибозном сахаре; полную замену фосфатного фрагмента «дефосфорилированными» линкерами; модификацию или замену природного основания; замену или модификацию рибозофосфатного остова.

Поскольку нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры из субъединиц, многие из модификаций встречаются в положении, которое повторяется внутри

нуклеиновой кислоты, например, модификация основания или фосфатного фрагмента, или не образующего связь О фосфатного фрагмента. В некоторых случаях модификация будет находиться во всех положениях субъекта в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях этого не будет. Например, модификация может находиться только в 3'- или 5'-концевом положении, может происходить только в концевом участке, например, в положении концевого нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5, или 10 нуклеотидах цепи. Модификация может находиться в двухцепочечном участке, одноцепочечном участке или в обоих. Модификация может находиться только в двухцепочечной участке РНК или может находиться только в одноцепочечном участке РНК. Например, фосфоротиоатная модификация в положении несвязанного О может находиться только на одном или обоих концах, может находиться только в концевом участке, например, в положении концевого нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5, или 10 нуклеотидах в цепи, или может находиться в двухцепочечных и одноцепочечных участках, особенно на концах. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированными.

Это создает возможность, например, для повышения стабильности, для включения определенных оснований в выступающие концы или для включения модифицированных нуклеотидов или заместителей нуклеотидов в одноцепочечные выступающие концы, например, в 5'- или 3'-выступающий конец, или в оба конца. Например, может быть желательно включить пуриновые нуклеотиды в выступающие концы. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые основания в 3'- или 5'-выступающем конце могут быть модифицированы, например, с помощью модификации, описанной в настоящем документе. Модификации могут включать, например, использование модификаций во 2'-положении рибозного сахара с модификациями, известными в данной области, например, использование дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезоксидезокси-2'-фтор- (2'-F) или 2'-О-метилмодифицированных вместо рибозного сахара азотистого основания, и модификации в фосфатной группе, например, фосфоротиоатные модификации. Выступающие концы необязательно должны быть гомологичными последовательности-мишени.

В некоторых вариантах осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован LNA, CRN, cET, UNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтил, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-дезоксидезокси, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Цепи могут содержать более одной модификации. В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором.

По меньшей мере две различные модификации, как правило, присутствуют на смысловой цепи и антисмысловой цепи. Эти две модификации могут быть 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификациями или другими модификациями.

В некоторых вариантах осуществления  $N_a$  или  $N_b$  содержат модификации чередующегося паттерна. Термин “чередующийся мотив”, как используют в настоящем описании, относится к мотиву, содержащему одну или более модификаций, где каждая модификация находится в чередующихся нуклеотидах одной цепи. Чередующийся

нуклеотид может относиться к каждому второму нуклеотиду или каждому третьему нуклеотиду или аналогичному паттерну. Например, если А, В и С каждые представляют собой один тип модификации нуклеотида, чередующийся мотив может представлять собой “АВАВАВАВАВАВ...,” “ААВВААВВААВВ...,” “ААВААВААВААВ...,” “АААВАААВАААВ...,” “АААВВВАААВВВ...,” или “АВСАВСАВСАВС...,” *и т.д.*

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или различным. Например, если каждый А, В, С, D представляет собой один тип модификации в нуклеотиде, то чередующийся паттерн, т.е. модификации в каждом последующем нуклеотиде могут быть одинаковыми, но каждая из смысловых цепи или антисмысловых цепь может быть выбрана из нескольких возможных модификаций в чередующемся мотиве, таком как “АВАВАВ...,” “АСАСАС...” “ВДВДВД...” или “СДСДСД...,” *и т.д.*

В некоторых вариантах осуществления агент дцРНКи по изобретению содержит паттерн модификации для чередующегося мотива в смысловой цепи, который сдвинут относительно паттерна модификации для чередующегося мотива в антисмысловой цепи. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой цепи соответствует модифицированной другим способом группе нуклеотидов антисмысловой цепи и *vice versa*. Например, при спаривании смысловой цепи с антисмысловой цепью в дуплексе дцРНК, чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с “АВАВАВ” от 5'- к 3'-концу цепи, и чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с “ВАВАВА” от 5'- к 3'-концу цепи в дуплексной области. В качестве другого примера, чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с “ААВВААВВ” от 5'- к 3'-концу цепи, и чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с “ВВААВВАА” от 5'- к 3'-концу цепи в дуплексной области, таким образом, что между смысловыми цепью и антисмысловыми цепью имеется полный или частичный сдвиг паттернов модификации.

В некоторых вариантах осуществления агент дцРНКи содержит паттерн чередующегося мотива 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в смысловой цепи, который исходно имеет сдвиг относительно паттерна чередующегося мотива 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в антисмысловой цепи, т.е. 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид в парах оснований смысловой цепи с 2'-F-модифицированным нуклеотидом в антисмысловой цепи и наоборот. Положение 1 смысловой цепи может начинаться с 2'-F-модификации, и положение 1 антисмысловой цепи может начинаться с 2'-О-метил-модификации.

Введение одного или более мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в смысловую цепь или антисмысловую цепь нарушает исходный паттерн модификации, содержащийся в смысловой цепи или антисмысловой цепи. Такое нарушение паттерна модификации смысловой или антисмысловой цепи посредством введения одного или более мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в смысловую или антисмысловую цепь неожиданно повышает активность сайленсинга генов в отношении гена-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, когда мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах вводят в любую из цепей, модификация нуклеотида следующего после мотива является модификацией, отличной от модификации мотива. Например, участок последовательности, содержащий мотив, представляет собой "...N<sub>a</sub>Y<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>Y<sub>3</sub>N<sub>b</sub>...", где "Y" представляет собой модификацию мотива из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, и "N<sub>a</sub>" и "N<sub>b</sub>" представляют собой модификацию в нуклеotide, следующем после мотива "Y<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>Y<sub>3</sub>", которая отличается от модификации Y, и где N<sub>a</sub> и N<sub>b</sub> могут быть одинаковыми или различными модификациями. Альтернативно, N<sub>a</sub> или N<sub>b</sub> могут присутствовать или отсутствовать, если присутствует фланкирующая модификация.

иРНК может дополнительно содержать по меньшей мере одну тиофосфатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Модификация тиофосфатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи может находиться в любом нуклеotide смысловой цепи, антисмысловой цепи или в обеих цепях в любом положении цепи. Например, модификация межнуклеотидной связи может находиться в любом нуклеotide в смысловой цепи или антисмысловой цепи; каждая модификация межнуклеотидной связи может находиться в чередующемся паттерне в смысловой цепи или антисмысловой цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь могут содержать обе модификации межнуклеотидной связи в чередующемся паттерне. Чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи в смысловой цепи может быть одинаковым или отличным от антисмысловой цепи, и чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи в смысловой цепи может иметь сдвиг относительно чередующегося паттерна модификации межнуклеотидной связи в антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления агент двухцепочечная РНКи содержит 6-8 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, а смысловая цепь содержит по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи либо на 5'-конце, либо на 3'-конце.

В некоторых вариантах осуществления агент дцРНКи содержит модификацию фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в выступающей участке. Например, выступающий участок может содержать два нуклеотида с фосфоротиоатной или метилфосфонатную межнуклеотидную связь между двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также могут быть выполнены для соединения выступающих нуклеотидов с концевыми спаренными нуклеотидами в дуплексной области. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все выступающие нуклеотиды могут быть связаны посредством фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи, и необязательно могут присутствовать дополнительные фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, связывающие выступающий нуклеотид со спаренным нуклеотидом, который является следующим после выступающего нуклеотида. Например, может существовать по меньшей мере две тиофосфатные межнуклеотидные связи между

концевыми тремя нуклеотидами, в которых два из трех нуклеотидов представляют собой выступающие нуклеотиды, и третий представляет собой спаренный нуклеотид, следующий после выступающего нуклеотида. Предпочтительно эти концевые три нуклеотида могут находиться на 3'-конце антисмысловой цепи. Например, между тремя концевыми нуклеотидами могут присутствовать по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, в которых два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий является спаренным нуклеотидом, следующим после выступающего нуклеотида. Эти концевые три нуклеотида могут находиться на 3'-конце антисмысловой цепи, 3'-конце смысловой цепи, 5'-конце антисмысловой цепи или 5'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления выступающий конец из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи, и между тремя концевыми нуклеотидами присутствуют две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, где два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом, следующим после выступающего нуклеотида. Необязательно, агент дцРНКи может дополнительно иметь две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами как на 5'-конце смысловой цепи, так и на 5'-конце антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления агент дцРНКи содержит ошибочное(ошибочные) спаривание(спаривания) с мишенью в дуплексе или их комбинации. Ошибочное спаривание может встречаться в выступающем участке или дуплексной области. Пары оснований можно выстраивать на основании их способности способствовать диссоциации или плавлению (например, по свободной энергии ассоциации или диссоциации определенного спаривания, при этом наиболее простым подходом является изучение пар по отдельности для каждой пары оснований, однако также можно использовать анализ ближайшего соседа, или аналогичный анализ). С точки зрения содействия диссоциации: A:U более предпочтительна, чем G:C; G:U более предпочтительна, чем G:C; и I:C более предпочтительна, чем G:C (I=инозин). Ошибочные спаривания, например, неканонические или отличные от канонических спаривания (как описано в других местах в настоящем описании) являются предпочтительными по сравнению с каноническими типами спаривания (A:T, A:U, G:C); и типы спаривания, которые включают универсальное основание, являются предпочтительными по сравнению с каноническими типами спаривания.

В некоторых вариантах осуществления агент дцРНКи содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в дуплексных областях от 5'-конца антисмысловой цепи, независимо выбранную из группы: A:U, G:U, I:C и ошибочно спаренных пар, например, неканонических или отличных от канонических типов спаривания, или типов спаривания, которые включают универсальное основание, для содействия диссоциации антисмысловой цепи в 5'-конце дуплекса.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 в дуплексной

области от 5'-конца в антисмысловой цепи выбран из группы, состоящей из A, dA, dU, U и dT. Альтернативно, по меньшей мере одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований в дуплексной области от 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU. Например, первая пара оснований в дуплексной области от 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU.

В других вариантах осуществления нуклеотид на 3'-конце смысловой цепи представляет собой дезокситимин (dT) или нуклеотид на 3'-конце антисмысловой цепи представляет собой дезокситимин (dT). Например, имеется короткая последовательность дезокситиминовых нуклеотидов, например, два нуклеотида dT на 3'-конце смысловой, антисмысловой цепи или обеих цепей.

В некоторых вариантах осуществления последовательность смысловой цепи может быть представлена формулой (I):



где:

$i$  и  $j$  каждый независимо равен 0 или 1;

$r$  и  $q$  каждый независимо равен 0-6;

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

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

каждый  $n_p$  и  $n_q$  независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

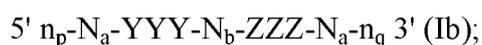
где  $N_b$  и  $Y$  имеют неодинаковую модификацию; и

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

В некоторых вариантах осуществления  $N_a$  или  $N_b$  содержит модификации чередующегося паттерна.

В некоторых вариантах осуществления мотив  $YYY$  располагается в сайте расщепления смысловой цепи или около него. Например, когда агент дцРНКи содержит дуплексную область из 17-23 нуклеотидов, мотив  $YYY$  может находиться в сайте расщепления или около него (например, может находиться в положениях 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 или 11, 12, 13) смысловой цепи, при этом отсчет начинается с первого нуклеотида от 5'-конца, или необязательно отсчет начинается с первого спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца.

В одном варианте осуществления  $i$  равно 1 и  $j$  равно 0, или  $i$  равно 0 и  $j$  равно 1, или оба  $i$  и  $j$  равны 1. Таким образом, смысловая цепь может быть представлена следующими формулами:



5' n<sub>p</sub>-N<sub>a</sub>-XXX-N<sub>b</sub>-YYY-N<sub>a</sub>-n<sub>q</sub> 3' (Ic); или  
 5' n<sub>p</sub>-N<sub>a</sub>-XXX-N<sub>b</sub>-YYY-N<sub>b</sub>-ZZZ-N<sub>a</sub>-n<sub>q</sub> 3' (Id).

Когда смысловая цепь представлена формулой (Ib), N<sub>b</sub> представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N<sub>a</sub> независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда смысловая цепь представлена в виде формулы (Ic), N<sub>b</sub> представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N<sub>a</sub> может независимо представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда смысловая цепь представлена в виде формулы (Id), каждый N<sub>b</sub> независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно, N<sub>b</sub> представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5, или 6. Каждый N<sub>a</sub> может независимо представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

В других вариантах осуществления i равно 0 и j равно 0, и смысловая цепь может быть представлена формулой:

5' n<sub>p</sub>-N<sub>a</sub>-YYY- N<sub>a</sub>-n<sub>q</sub> 3' (Ia).

Когда смысловая цепь представлена формулой (Ia), каждый N<sub>a</sub> независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления последовательность антисмысловой цепи РНКи может быть представлена формулой (II):

5' n<sub>q</sub>'-N<sub>a</sub>'-(Z'Z'Z')<sub>k</sub>-N<sub>b</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-(X'X'X')<sub>l</sub>-N<sub>a</sub>'-n<sub>p</sub>' 3' (II)

где:

k и l каждый независимо равен 0 или 1;

p' и q' каждый независимо равен 0-6;

каждый N<sub>a</sub>' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два различно модифицированных нуклеотида;

каждый N<sub>b</sub>' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

каждый n<sub>p</sub>' и n<sub>q</sub>' независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

где N<sub>b</sub>' и Y' имеют неодинаковую модификацию; и

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

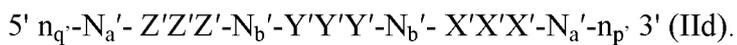
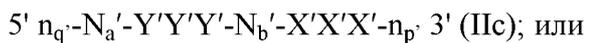
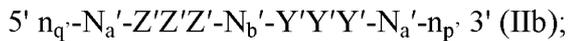
В некоторых вариантах осуществления  $N_a'$  или  $N_b'$  содержит модификации чередующегося паттерна.

Мотив  $Y'Y'Y'$  располагается в сайте расщепления антисмысловой цепи или около него. Например, когда агент дцРНКи содержит дуплексную область из 17-23 нуклеотидов в длину, мотив  $Y'Y'Y'$  может находиться в положениях 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; или 13, 14, 15 антисмысловой цепи, при этом отсчет начинается с первого нуклеотида от 5'-конца, или необязательно отсчет начинается с первого спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца. Предпочтительно мотив  $Y'Y'Y'$  находится в положениях 11, 12, 13.

В некоторых вариантах осуществления мотив  $Y'Y'Y'$  представляет собой все 2'-ОМе модифицированные нуклеотиды.

В некоторых вариантах осуществления  $k$  равно 1 и  $l$  равно 0, или  $k$  равно 0 и  $l$  равно 1, или оба  $k$  и  $l$  равны 1.

Таким образом, антисмысловая цепь может быть представлена следующими формулами:

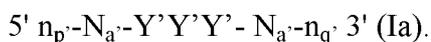


Когда антисмысловая цепь представлена формулой (IIb),  $N_b'$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20,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

Когда антисмысловая цепь представлена в виде формулы (IIc),  $N_b'$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда антисмысловая цепь представлена в виде формулы (IId), каждый  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно,  $N_b'$  имеет значение 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В других вариантах осуществления  $k$  равно 0 и  $l$  равно 0 и антисмысловая цепь может быть представлена формулой:



Когда антисмысловая цепь представлена в виде формулы (IIa), каждый  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

Каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи можно независимо модифицировать LNA, CRN, UNA, cEt, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-гидроксиллом или 2'-фтором. Например, каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицируют 2'-О-метилом или 2'-фтором. В частности, каждый  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$ ,  $X'$ ,  $Y'$  и  $Z'$  может представлять собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь агента дцРНКи может содержать мотив  $YYY$ , находящийся в положениях 9, 10 и 11 смысловой цепи, когда длина дуплексной области составляет 21 нуклеотид, где отсчет начинается с первого нуклеотида от 5'-конца; или необязательно отсчет начинается с первого спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца; и  $Y$  представляет собой 2'-F-модификацию. Смысловая цепь может дополнительно содержать мотив  $XXX$  или мотивы  $ZZZ$  в качестве фланкирующих модификаций с противоположного конца дуплексной области; и  $XXX$  и  $ZZZ$  каждый независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F модификацию.

В одном из вариантов осуществления антисмысловая цепь может содержать мотив  $Y'Y'Y'$ , находящийся в положениях 11, 12, 13 цепи, где отсчет начинается с первого нуклеотида от 5'-конца, или необязательно отсчет начинается с первого спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца; и  $Y'$  представляет собой 2'-О-метил-модификацию. Антисмысловая цепь может дополнительно содержать мотив  $X'X'X'$  или мотивы  $Z'Z'Z'$  в качестве фланкирующих модификаций с противоположного конца дуплексной области; и  $X'X'X'$  и  $Z'Z'Z'$  каждый независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

Смысловая цепь, представленная любой из указанных выше формул (Ia), (Ib), (Ic) и (Id), образует дуплекс, где антисмысловая цепь представлена любой из формул (IIa), (IIb), (IIc) и (IId), соответственно.

Таким образом, агенты дцРНКи для применения в способах по изобретению могут содержать смысловую цепь и антисмысловую цепь, где каждая цепь содержит от 14 до 30 нуклеотидов, дуплекс РНКи, представленный формулой (III):

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

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

(III)

где:

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

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

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

каждый  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную

последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

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

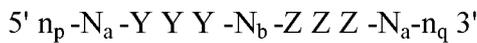
$XXX$ ,  $YYY$ ,  $ZZZ$ ,  $X'X'X'$ ,  $Y'Y'Y'$  и  $Z'Z'Z'$  каждый независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах.

В одном варианте осуществления  $i$  равно 0 и  $j$  равно 0; или  $i$  равно 1 и  $j$  равно 0; или  $i$  равно 0 и  $j$  равно 1; или оба  $i$  и  $j$  равны 0; или оба  $i$  и  $j$  равны 1. В другом варианте осуществления  $k$  равно 0 и  $l$  равно 0; или  $k$  равно 1 и  $l$  равно 0;  $k$  равно 0 и  $l$  равно 1; или оба  $k$  и  $l$  равны 0; или оба  $k$  и  $l$  равны 1.

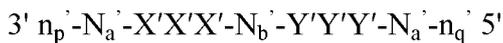
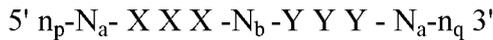
Примеры комбинаций смысловой цепи и антисмысловой цепи, образующих дуплекс иРНК, включают приведенные ниже формулы:



(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



(III d)

Когда агент дцРНКи представлен формулой (IIIa), каждый  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда агент дцРНКи представлен формулой (IIIb), каждый  $N_b$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

Когда агент дцРНКи представлен формулой (III d), каждый  $N_b$ ,  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a$ ,  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или

2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждый из  $N_a$ ,  $N_a'$ ,  $N_b$ , и  $N_b'$  независимо содержит модификации чередующегося паттерна.

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

Когда агент дцРНКи представлен формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIIId), по меньшей мере один из нуклеотидов  $Y$  может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов  $Y'$ . Альтернативно, по меньшей мере два из нуклеотидов  $Y$  образуют пару оснований с соответствующими нуклеотидами  $Y'$ , или все три нуклеотида  $Y$  все образуют пару оснований с соответствующими нуклеотидами  $Y'$ .

Когда агент дцРНКи представлен формулой (IIIb) или (IIIId), по меньшей мере один из нуклеотидов  $Z$  может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов  $Z'$ . Альтернативно, по меньшей мере два из нуклеотидов  $Z$  образуют пару оснований с соответствующими нуклеотидами  $Z'$ , или все три нуклеотида  $Z$  все образуют пару оснований с соответствующими нуклеотидами  $Z'$ .

Когда агент дцРНКи представлен формулой (IIIc) или (IIIId), по меньшей мере один из нуклеотидов  $X$  может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов  $X'$ . Альтернативно, по меньшей мере два из нуклеотидов  $X$  образуют пару оснований с соответствующими нуклеотидами  $X'$ , или все три нуклеотида  $X$  все образуют пару оснований с соответствующими нуклеотидами  $X'$ .

В некоторых вариантах осуществления модификация в нуклеотиде  $Y$  отличается от модификации в нуклеотиде  $Y'$ , модификация в нуклеотиде  $Z$  отличается от модификации в нуклеотиде  $Z'$  или модификация в нуклеотиде  $X$  отличается от модификации в нуклеотиде  $X'$ .

В некоторых вариантах осуществления, когда агент дцРНКи представлен формулой (IIIId), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации. В других вариантах осуществления, когда агент РНКи представлен формулой (IIIId), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации и  $n_p' > 0$  и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи. В других вариантах осуществления, когда агент РНКи представлен формулой (IIIId), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p' > 0$  и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи, и смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера (описано ниже). В других вариантах осуществления, когда агент РНКи представлен формулой (IIIId), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p' > 0$  и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи, смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В некоторых вариантах осуществления, когда агент дцРНКи представлен формулой (Ша), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p' > 0$  и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи, смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В некоторых вариантах осуществления агент дцРНКи представляет собой мультимер, содержащий по меньшей мере два дуплекса, представленных формулой (Ш), (Ша), (Шб), (Шс), и (Шд), где дуплексы соединены линкером. Линкер может являться расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может воздействовать на один и тот же ген или два различных гена, или каждый из дуплексов может воздействовать на один и тот же ген в двух различных участках-мишенях.

В некоторых вариантах осуществления агент дцРНКи представляет собой мультимер, содержащий три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулами (Ш), (Ша), (Шб), (Шс) и (Шд), где дуплексы соединены линкером. Линкер может являться расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может воздействовать на один и тот же ген или два различных гена, или каждый из дуплексов может воздействовать на один и тот же ген в двух различных участках-мишенях.

В одном варианте осуществления два агента дцРНКи, представленные формулой (Ш), (Ша), (Шб), (Шс) и (Шд), соединены друг с другом на 5'-конце, и один или оба 3'-конца необязательно конъюгированы с лигандом. Каждое из средств может целенаправленно воздействовать на один и тот же ген или на два различных гена, или каждое из средств может целенаправленно воздействовать на один и тот же ген в двух различных участках-мишенях.

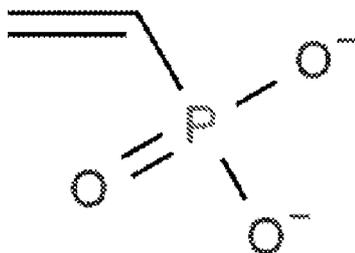
В некоторых вариантах осуществления агент РНКи по изобретению может содержать небольшое количество нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификацию, например, 10 или менее нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией. Например, агент РНКи может содержать 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией.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

В других вариантах осуществления агент РНКи по изобретению может содержать сверхнизкое количество нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификацию, например, 2 или менее нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификацию. Например, агент РНКи может

содержать 2, 1 из 0 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией. В конкретном варианте осуществления агент РНКи может содержать 2 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией, например, 0 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией в смысловой цепи и 2 нуклеотида с модификацией 2'-фтор в антисмысловой цепи.

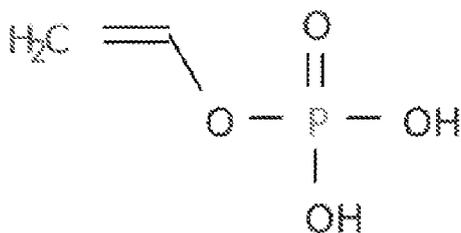
В различных публикациях описаны мультимерные иРНК, которые можно использовать в способах по изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, патент США No. 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887, и WO2011/031520, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством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

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению включают винилфосфонатную (VP) модификацию агента РНКи, как описано в настоящем документе. В типичных вариантах осуществления винилфосфонат согласно настоящему изобретению имеет следующую структуру:



Винилфосфонат по настоящему изобретению может быть присоединен либо к антисмысловой, либо к смысловой цепи дцРНК по настоящему изобретению. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления винилфосфонат по настоящему изобретению присоединен к антисмысловой цепи дцРНК, необязательно на 5'-конце антисмысловой цепи дцРНК.

Модификации винилфосфата также предусмотрены для композиций и способов согласно настоящему описанию. Типичная структура винилфосфата представляет собой:



Как более подробно описано ниже, иРНК, которая содержит конъюгации одной или нескольких углеводных групп с иРНК, может оптимизировать одно или несколько свойств иРНК. Во многих случаях углеводная группа будет присоединена к модифицированной субъединице иРНК. Например, сахар рибозы одной или более рибонуклеотидных субъединиц иРНК можно замещать другими группами, например, неуглеводным (предпочтительно циклическим) носителем, к которому прикреплен углеводный лиганд. Рибонуклеотидная субъединица, в которой сахар рибозы субъединицы замещен таким

образом, обозначают в настоящем описании как субъединицу модификации замены рибозы (RRMS). Циклический носитель может представлять собой карбоциклическую кольцевую систему, т.е. все атомы кольца представляют собой атомы углерода, или гетероциклическую кольцевую система, т.е. один или более атомов кольца могут представлять собой гетероатом, например, азот, кислород, серу. Циклический носитель может представлять собой моноциклическую систему или может содержать два или более колец, например, конденсированных колец. Циклический носитель может представлять собой полностью насыщенную циклическую систему, или он может содержать одну или более двойных связей.

Лиганд может быть связан с полинуклеотидом посредством носителя. Носители включает (i) по меньшей мере одну "точку присоединения в остове", предпочтительно две "точки присоединения в остове" и (ii) по меньшей мере одну "связывающую точку присоединения". "Точка присоединения в остове", как используют в настоящем описании, относится к функциональной группе, например, гидроксильной группе, или, как правило, доступной связи, и которая является подходящей для введения носителя в остов, например, фосфат или модифицированный фосфат, например, содержащий серу остов рибонуклеиновой кислоты. "Связывающая точка присоединения" (TAP) в некоторых вариантах осуществления относится к входящему в состав кольца атому циклического носителя, например, атому углерода или гетероатому (отличному от атома, который представляет собой точку присоединения в остове), которая соединяет выбранную группу. Группа может представлять собой, например, углевод, например, моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид и полисахарид. Необязательно выбранная группа соединена посредством промежуточной связи с циклическим носителем. Таким образом, циклический носитель часто включает функциональную группу, например, аминогруппу или, как правило, обеспечивает связь, которая является подходящей для введения или связывания другой химической структуры, например, лиганда с компонентом кольца.

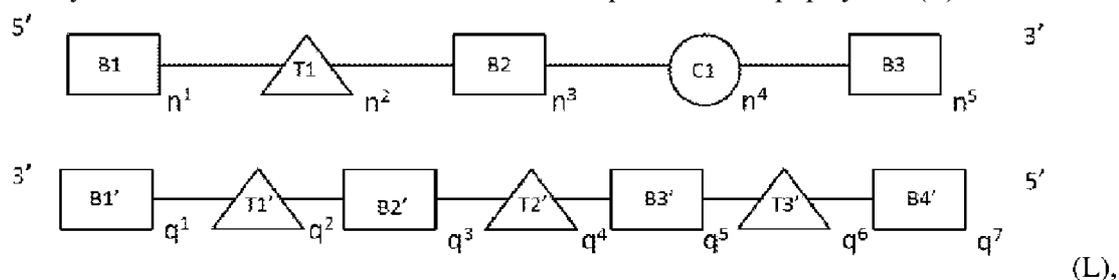
иРНК может быть конъюгировано с лигандом посредством носителя, где носитель может представлять собой циклическую группу или ациклическую группу; предпочтительно циклическая группа выбрана из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксолана,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

#### i. Термически дестабилизирующие модификации

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК может быть оптимизирована для РНК-интерференции путем включения термически дестабилизирующих модификаций в затравочную область антисмысловой цепи (т.е. в положениях 2-9 5'-конца антисмысловой цепи) для уменьшения или ингибирования сайленсинга нецелевого гена. Было обнаружено, что дцРНК с антисмысловой цепью,

содержащей по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса в пределах первых 9 положений нуклеотида, считая от 5'-конца антисмысловой цепи, обладают сниженной активностью подавления нецелевого гена. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять или более) термически дестабилизирующую модификацию дуплекса в пределах первых 9 положений нуклеотида 5' области антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько термически дестабилизирующих модификаций дуплекса расположены в положениях 2-9 или предпочтительно в положениях 4-8 от 5'-конца антисмысловой нити. В некоторых дополнительных вариантах осуществления термически дестабилизирующая(дестабилизирующие) модификация(модификации) дуплекса расположена(расположены) в положении 6, 7 или 8 от 5'-конца антисмысловой нити. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса расположена в положении 7 от 5'-конца антисмысловой нити. Термин «термически дестабилизирующая(дестабилизирующие) модификация(модификации)» включает модификацию(модификации), которая приводит к получению дцРНК с более низкой общей температурой плавления ( $T_m$ ) (предпочтительно  $T_m$  на один, два, три или четыре градуса ниже, чем  $T_m$  дцРНК без такой модификации(модификаций). В некоторых вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса расположена в положении 2, 3, 4, 5 или 9 от 5'-конца антисмысловой цепи.

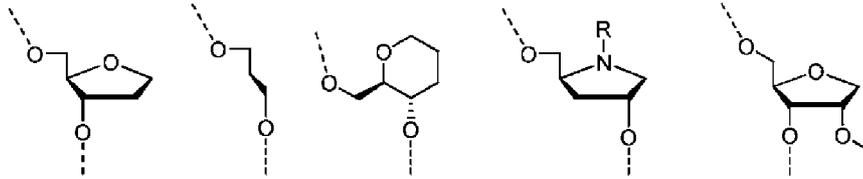
Агент иРНК включает смысловую цепь и антисмысловую цепь, каждая нить имеет от 14 до 40 нуклеотидов. Агент РНКи может быть представлен формулой (L):



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

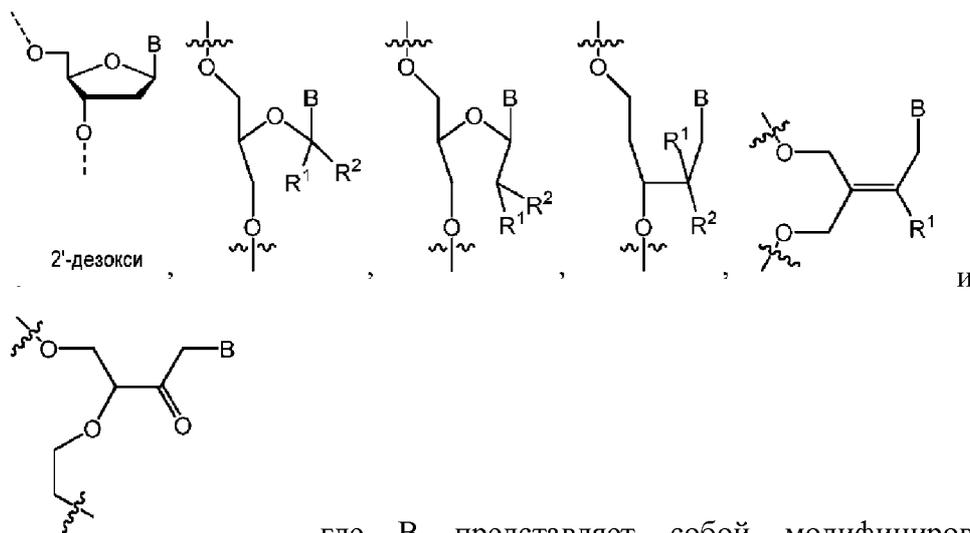
C1 представляет собой термически дестабилизирующий нуклеотид, расположенный в месте, противоположном затравочной области антисмысловой цепи (т.е. в положениях 2-8 5'-конца антисмысловой цепи). Например, C1 находится в положении смысловой цепи,

которое спаривается с нуклеотидом в положениях 2-8 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере, C1 находится в положении 15 от 5'-конца смысловой нити. Нуклеотид C1 имеет термически дестабилизирующую модификацию, которая может включать модификацию с удаленным азотистым основанием; несоответствие с противоположным нуклеотидом в дуплексе; и модификацию сахара, например, 2'-дезоксимо-модификацию или ациклический нуклеотид, например, незапертая нуклеиновая кислота (UNA) или глицериновая нуклеиновая кислота (GNA). В одном варианте осуществления C1 имеет термически дестабилизирующую модификацию, выбранную из группы, состоящей из: i) несоответствия с противоположным нуклеотидом в антисмысловой цепи; ii) модификации с удаленным азотистым основанием, выбранной из группы, состоящей из:



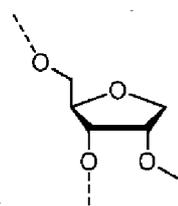
; и iii) модификации

сахара, выбранной из группы, состоящей из:



, где В представляет собой модифицированное или

немодифицированное нуклеосаждение,  $R^1$  и  $R^2$  независимо представляют собой H, галоген,  $OR_3$  или алкил; и  $R_3$  представляет собой H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар. В одном варианте осуществления термически дестабилизирующая модификация в C1 представляет собой ошибку спаривания, выбранную из группы, состоящей из G:G, G:A, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U, C:T, U:U, T:T и U:T; и, необязательно, по меньшей мере одно нуклеосаждение в паре несоответствия представляет собой 2'-дезоксид нуклеосаждение. В одном примере, термически дестабилизирующая модификация



в C1 представляет собой GNA или

T1, T1', T2' и T3' каждый независимо представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию, обеспечивающую стерический объем нуклеотида, который меньше или равен стерическому объему 2'-ОМе-модификации. Стерический объем относится к сумме стерических эффектов модификации. Способы определения стерических эффектов модификации нуклеотида известны специалистам в данной области. Модификация может быть во 2'-положении рибозного сахара нуклеотида или модификацией нерибозного нуклеотида, ациклического нуклеотида или остова нуклеотида, который аналогичен или эквивалентен 2'-положению рибозного сахара, и обеспечивает нуклеотиду стерический объем, который меньше или равен стерическому объему 2'-ОМе-модификации. Например, T1, T1', T2' и T3', каждый, независимо выбран из ДНК, РНК, LNA, 2'-F и 2'-F-5'-метила. В одном варианте осуществления T1 представляет собой ДНК. В одном варианте осуществления T1' представляет собой ДНК, РНК или LNA. В одном варианте осуществления T2' представляет собой ДНК или РНК. В одном варианте осуществления T3' представляет собой ДНК или РНК.

$n^1$ ,  $n^3$  и  $q^1$  независимо имеют длину 4-15 нуклеотидов.

$n^5$ ,  $q^3$  и  $q^7$  независимо имеют длину 1-6 нуклеотидов.

$n^4$ ,  $q^2$  и  $q^6$  независимо имеют длину 1-3 нуклеотида; альтернативно,  $n^4$  равно 0.

$q^5$  независимо имеет длину 0-10 нуклеотидов.

$n^2$  и  $q^4$  независимо имеют длину 0-3 нуклеотида.

Альтернативно,  $n^4$  имеет длину 0-3 нуклеотида.

В одном варианте осуществления  $n^4$  может иметь значени 0. В одном примере,  $n^4$  равно 0, и  $q^2$  и  $q^6$  равны 1. В другом примере,  $n^4$  равно 0, и  $q^2$  и  $q^6$  равны 1, с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи).

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

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

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

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

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

В иллюстративном варианте осуществления, T3' начинается с положения 2 от 5'-конца антисмысловой нити и T1' начинается с положения 14 от 5'-конца антисмысловой

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

В одном варианте осуществления T1' и T3' разделены 11 нуклеотидами в длину (то есть не считая нуклеотиды T1' и T3').

В одном варианте осуществления T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой нити. В одном примере, T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой нити и  $q^2$  равняется 1, и модификация в 2'-положении или в положениях нерибозного, ациклического или остова, которые обеспечивают меньший стерический объем, чем 2'-ОМе рибоза.

В одном варианте осуществления T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой нити. В одном примере, T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой нити и  $q^6$  равняется 1, и модификация в 2'-положении или в положениях нерибозного, ациклического или остова, которые обеспечивают менее чем или равен стерическому объему, чем 2'-ОМе рибоза.

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

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

В иллюстративном варианте осуществления, T1 находится в сайте расщепления смысловой цепи, например, в положении 11 от 5'-конца смысловой цепи, когда длина смысловой цепи составляет 19-22 нуклеотида, и  $n^2$  равно 1; T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой нити, и  $q^2$  равняется 1, и модификация T1' находится во 2'-положении рибозного сахара или в положениях нерибозного, ациклического или остова, которые обеспечивают меньший стерический объем, чем 2'-ОМе рибоза; T2' находится в положениях 6-10 от 5'-конца антисмысловой нити, и  $q^4$  равно 1; и T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой нити, и  $q^6$  равняется 1, и модификация T3' находится во 2'-положении или в положениях нерибозной, ациклической или остова, которые обеспечивают меньшую или равную стерическому объему, чем 2'-ОМе рибоза.

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

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



$q^3$  равно 4, T2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  равно 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 5, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 6, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 7, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4, T2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  равно 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 5, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи).

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4, T2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  равно 1, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 6, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4, T2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  равно 1, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 6, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи).

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 5, T2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  равно 1, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 5, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1; необязательно, по меньшей мере, с 2 дополнительными ТТ на 3'-конце антисмысловой цепи.

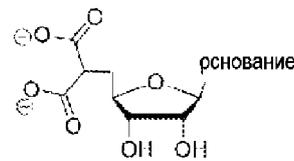


F,  $q^5$  равно 5, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи).

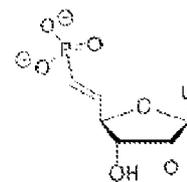
В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  равно 1.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи).

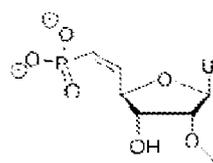
Агент РНКи может содержать фосфорсодержащую группу на 5'-конце смысловой цепи или антисмысловой цепи. 5'-концевая фосфорсодержащая группа может быть 5'-концевой фосфатной (5'-P), 5'-концевой фосфоротиоатной (5'-PS), 5'-концевой фосфородитиоатной (5'-PS<sub>2</sub>), 5'-концевой винилфосфонатной (5'-VP), 5'-концевой



метилфосфонатной (MePhos) или 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил ( ). Когда 5'-концевая фосфорсодержащая группа представляет собой 5'-концевой винилфосфонат (5'-



VP), 5'-VP может быть изомером 5'-E-VP (т.е. транс-винилфосфат, ),



изомером 5'-Z-VP (т.е. цис-винилфосфат, ), или их смесью.





1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4, T2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  равно 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 5, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5' - PS<sub>2</sub>.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4, T2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  равно 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 5, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1. Агент РНКи также содержит 5'-Р.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет

собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1. Агент дцРНК также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1. Агент РНКи также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1. Агент РНКи также содержит 5'-PS<sub>2</sub>.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1. Агент РНКи также содержит 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца). Агент РНКи также содержит 5'-P.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1; с двумя







8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4, T2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  равно 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 5, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-дезоксигуанидин-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  равно 1. Агент РНКи также содержит 5'-P.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  равно 1. Агент РНКи также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  равно 1. Агент РНКи также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  равно 1. Агент РНКи также содержит 5'-PS<sub>2</sub>.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно

8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  равно 1. Агент РНКи также содержит 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-P.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, ТЗ' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-PS<sub>2</sub>.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, ТЗ' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4, T2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  равно 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 5, ТЗ' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-Р и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-Р находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4, T2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  равно 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-

F,  $q^5$  равно 5, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4, T2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  равно 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 5, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинация), и нацеливающий лиганд.

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

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4, T2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  равно 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 5, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-PS<sub>2</sub> и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS<sub>2</sub> находится на 5'-конце антисмысловой цепи и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

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

F,  $q^5$  равно 5, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца). Агент РНКи также содержит 5'-P и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-P находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца). Агент РНКи также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет

собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца). Агент РНКи также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинация) и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца). Агент РНКи также содержит 5'-PS<sub>2</sub> и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS<sub>2</sub> находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца). Агент РНКи также содержит 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4, T2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  равно 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 5, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$

равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-Р и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-Р находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, Т1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, Т1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4, Т2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  равно 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 5, Т3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, Т1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, Т1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4, Т2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  равно 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 5, Т3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинация) и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

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

равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-PS<sub>2</sub> и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS<sub>2</sub> находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n<sup>1</sup> равно 8, T1 представляет собой 2'F, n<sup>2</sup> равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>3</sup> равно 7, n<sup>4</sup> равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>5</sup> равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>1</sup> равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q<sup>2</sup> равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>3</sup> равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q<sup>4</sup> равно 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> равно 5, T3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и q<sup>7</sup> равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n<sup>1</sup> равно 8, T1 представляет собой 2'F, n<sup>2</sup> равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>3</sup> равно 7, n<sup>4</sup> равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>5</sup> равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>1</sup> равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q<sup>2</sup> равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>3</sup> равно 4, q<sup>4</sup> равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> равно 7, T3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и q<sup>7</sup> равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-P и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-P находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n<sup>1</sup> равно 8, T1 представляет собой 2'F, n<sup>2</sup> равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>3</sup> равно 7, n<sup>4</sup> равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>5</sup> равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>1</sup> равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q<sup>2</sup> равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>3</sup> равно 4, q<sup>4</sup> равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> равно 7, T3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и q<sup>7</sup> равно 1; с двумя модификациями

фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинация) и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-PS<sub>2</sub> и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS<sub>2</sub> находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  равно 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  равно 7,  $n^4$  равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  равно 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  равно 4,  $q^4$  равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  равно 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (отсчет от 5'-

конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (отсчет от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-дезоксипентозин-5'-С-малонил и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-дезоксипентозин-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В конкретном варианте осуществления агент РНКи по настоящему изобретению включает:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

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

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

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 23 нуклеотида;

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

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 21 и 22, и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (отсчет от 5'-конца);

где агенты дцРНК имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления агент РНКи по настоящему изобретению включает:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

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

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

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (отсчет от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 23 нуклеотида;

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

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22, и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (отсчет от 5'-конца);

где агенты РНКи имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи, и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления агент РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

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

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

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (отсчет от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 23 нуклеотида;

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

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22, и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (отсчет от 5'-конца);

где агенты РНКи имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи, и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления агент РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

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

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

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (отсчет от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

- (i) длину 23 нуклеотида;
- (ii) модификации 2'-ОМе в положениях 1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, и 21-23, и модификации 2'-F в положениях 2-4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20 (отсчет от 5'-конца); и
- (iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22, и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (отсчет от 5'-конца);

где агенты РНКи имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи, и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления агент РНКи по настоящему изобретению содержит:

- (a) смысловую цепь, имеющую:
  - (i) длину 21 нуклеотид;
  - (ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;
  - (iii) модификации 2'-ОМе в положениях 1-9 и 12-21, и модификации 2'-F в положениях 10 и 11; и
  - (iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (отсчет от 5'-конца);

и

- (b) антисмысловую цепь, имеющую:
  - (i) длину 23 нуклеотида;
  - (ii) модификации 2'-ОМе в положениях 1, 3, 5, 7, 9, 11-13, 15, 17, 19 и 21-23, и модификации 2'-F в положениях 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18 и 20 (отсчет от 5'-конца); и
  - (iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22, и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (отсчет от 5'-конца);

где агенты РНКи имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи, и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления агент РНКи по настоящему изобретению содержит:

- (a) смысловую цепь, имеющую:
  - (i) длину 21 нуклеотид;
  - (ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;
  - (iii) модификации 2'-F в положениях 1, 3, 5, 7, 9-11, и 13, и модификации 2'-ОМе в положениях 2, 4, 6, 8, 12 и 14-21; и
  - (iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (отсчет от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 23 нуклеотида;

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

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22, и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (отсчет от 5'-конца);

где агенты РНКи имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи, и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления агент РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

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

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

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (отсчет от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 25 нуклеотидов;

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

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22, и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (отсчет от 5'-конца);

где агенты РНКи имеют выступающий конец из четырех нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи, и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления агент РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

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

(iii) модификации 2'-ОМе в положениях 1-6, 8 и 12-21, и модификации 2'-F в

положениях 7 и 9-11; и

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (отсчет от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 23 нуклеотида;

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

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22, и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (отсчет от 5'-конца);

где агенты РНКи имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи, и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления агент РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

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

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

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (отсчет от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 23 нуклеотида;

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

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22, и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (отсчет от 5'-конца);

где агенты РНКи имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи, и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления агент РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 19 нуклеотидов;

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

разветвленного линкера;

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

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (отсчет от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

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

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 19 и 20, и между положениями нуклеотидов 20 и 21 (отсчет от 5'-конца);

где агенты РНКи имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи, и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления иРНК для применения в способах по изобретению представляет собой агент, выбранный из агентов, перечисленных в любой из таблиц 2-5, 14 и 15. Эти агенты могут дополнительно содержать лиганд.

III. иРНК, конъюгированные с лигандами

Другая модификация РНК в иРНК по изобретению вовлекает химическое связывание РНК с одним или несколькими лигандами, фрагментами или конъюгатами, которые усиливают активность, клеточное распределение или клеточное поглощение иРНК, например, в клетку. Такие фрагменты включают, но не ограничиваются ими, липидные фрагменты, такие как холестеринный фрагмент (Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556). В других вариантах осуществления лиганд представляет собой холевую кислоту (Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053-1060), тиоэфир, например, берил-S-тримитилтиол (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538), алифатическую цепь, например, додекандиоловый или ундециловый остатки (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J*, 1991, 10:1111-1118; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327-330; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49-54), фосфолипид, например, дигексадецил-гас-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-О-гексадецил-гас-глицеро-3-фосфонат (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777-3783), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973), или адамантануксусную кислоту (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), пальмитиловую часть (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237), или октадециламиновую или гексиламинокарбонилкоксихолестеринную часть (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

В некоторых вариантах осуществления лиганд изменяет распределение,

нацеливание или время жизни агента иРНК, в которую он включен. В предпочтительных вариантах осуществления лиганд обеспечивает повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, например, молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, например, клеточного компартмента или части органа, ткани, органа или части тела, например, по сравнению с видами, у которых отсутствует такой лиганд. Предпочтительные лиганды не будут принимать участие в спаривании дуплекса в дуплексной нуклеиновой кислоте.

Лиганды могут включать встречающееся в природе вещество, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин или гиалуроновая кислота); или липид. Лиганд также может представлять собой рекомбинантную или синтетическую молекулу, такую как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминокислота. Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, представляющую собой полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирол-ангидрид малеиновой кислоты, сополимер поли(L-лактида и гликоля), сополимер дивиниловый простой эфир-малеиновый ангидрид, N-(2-гидроксипропил)метакриламидный сополимер (HMPA), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловая кислота), N-изопропилакриламидные полимеры или полифосфазин. Примеры полиаминов включают: полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметик-полиамин, дендример-полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или альфа-спиральный пептид.

Лиганды также могут включать нацеливающие группы, например, нацеливающее на клетку или ткань средство, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как клетка почки. Нацеливающая группа может представлять собой тиротропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, белок А сурфактанта, углевод муцина, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин B12, витамин A, биотин или пептид RGD или миметик пептида RGD. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой поливалентную галактозу, например, N-ацетилгалактозамин.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие агенты (например акридины), поперечно-сшивающие агенты (например псорален, митомицин C), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например ЭДТА), липофильные молекулы, например холестерин, холевую кислоту,

адамantanуксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, О3-(олеоил)литохолевую кислоту, О3-(олеоил)холиновую кислоту, диметокситритил или феноксазин) и пептидные конъюгаты (например, пептид Antennapedia, пептид Tat), алкилирующие средства, фосфат, амино, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]<sub>2</sub>, полиамино, алкил, замещенный алкил, радиоактивно меченные маркеры, ферменты, гаптены (например биотин), средства, облегчающие транспорт/всасывание (например, аспирин, витамин Е, фолиевая кислота), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, акридин-имидазольные конъюгаты, Eu<sup>3+</sup> комплексы тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

Лиганды могут представлять собой белки, например, гликопротеины или пептиды, например, молекулы, обладающие специфической аффинностью в отношении дополнительного лиганда, или антитела, например, антитела, которое связывается с конкретным типом клеток, таким как клетка печени. Лиганды также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать непептидные структуры, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза или поливалентная фукоза. Лиганд может представлять собой, например, липополисахарид, активатор MAP-киназы p38 или активатор NF-κB.

Лиганд может представлять собой вещество, например, лекарственное средство, которое может повышать поглощение иРНК клеткой, например, путем разрушения цитоскелета клеток, например, путем разрушения клеточных микротрубочек, микрофиламентов или промежуточных филаментов. Лекарственное средство может представлять собой, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

В некоторых вариантах осуществления лиганд, связанный с иРНК, как описано в настоящем описании, действует в качестве фармакокинетического модулятора (модулятор РК). Модуляторы РК включают липофильные соединения, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, связывающие белок агенты, PEG, витамины и т.д. Иллюстративные модуляторы РК включают, но не ограничиваются ими, холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин. Также известно, что олигонуклеотиды, которые содержат ряд фосфоротиоатных связей, связываются с сывороточным белком, таким образом, короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды примерно из 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие множество фосфоротиоатных связей в остове, также пригодны в настоящем изобретении в качестве лигандов (например, в качестве РК-модулирующих лигандов). Кроме того, также для применения в качестве РК-модулирующих лигандов в

вариантах осуществления, описанных в настоящем описании, пригодны аптамеры, которые связывают компоненты сыворотки (например, сывороточные белки).

Конъюгированные с лигандом иРНК по изобретению можно синтезировать с использованием олигонуклеотида, который содержит выступающую реакционноспособную функциональную группу, такую как группа, полученная путем присоединения линкерной молекулы к олигонуклеотиду (как описано). Этот реакционноспособный олигонуклеотид можно подвергать реакции непосредственно с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезированы так, чтобы они содержали любую из множества защитных групп, или лигандами, которые имеют присоединенную к ним связующий фрагмент.

Олигонуклеотиды, используемые в конъюгатах по настоящему изобретению, можно удобным и обычным способом получать с помощью хорошо известного способа твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза продается несколькими поставщиками, включая, например, Applied Biosystems® (Foster City, Calif.). Дополнительно или альтернативно, можно использовать любые другие способы для такого синтеза, известные в данной области. Также известно использование сходных технологий для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфоротиоаты и алкилированные производные.

Лиганд-конъюгированные иРНК и лиганд-молекула, несущая последовательность-специфические связанные нуклеозиды по настоящему изобретению, олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем синтезаторе ДНК с использованием стандартных предшественников нуклеотида или нуклеозида, или предшественников нуклеотид- или нуклеозид-конъюгатов, которые уже несут связывающий фрагмент, предшественников лиганд-нуклеотида или нуклеозид-конъюгата, которые уже несут молекулу лиганда, или строительных блоков, несущих лиганд, отличный от нуклеозида.

При использовании предшественников нуклеотид-конъюгатов, которые уже содержат связывающий фрагмент, синтез последовательность-специфических связанных нуклеозидов, обычно завершают, и затем молекулу лиганда подвергают реакции со связывающим фрагментом с образованием лиганд-конъюгированного олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды или связанные нуклеозиды по настоящему изобретению синтезируют с помощью автоматического синтезатора с использованием фосфорамидитов, происходящих из лиганд-нуклеозидных конъюгатов в дополнение к стандартным фосфорамидитам и нестандартным фосфорамидитам, которые являются коммерчески доступными и обычно используются в синтезе олигонуклеотидов.

#### А. Конъюгаты липидов

В некоторых вариантах осуществления лиганд или конъюгат представляет собой липид или молекулу на основе липида. Такой липид или молекула на основе липида предпочтительно связывается с сывороточным белком, например, сывороточным альбумином человека (HSA). HSA-связывающий лиганд обеспечивает распределение конъюгата в ткани-мишени, например, в отличной от тканей почек целевой ткани

организма. Например, целевая ткань может представлять собой печень, включая паренхимные клетки печени. Также в качестве лигандов можно использовать другие молекулы, которые могут связывать HSA. Например, можно использовать напроксен или аспирин. Липид или лиганд на основе липида может (а) повышать устойчивость к деградации конъюгата, (б) повышать нацеливающую способность или транспорт в целевую клетку или клеточную мембрану, или (с) может быть использован для корректировки связывания с белком сыворотки, например, HSA.

Лиганд на основе липида можно использовать для ингибирования, например, для контроля связывания конъюгата с целевой тканью. Например, липид или конъюгат на основе липидов, который связывается с HSA более сильно, с меньшей вероятностью будет нацеливаться на почку и, таким образом, с меньшей вероятностью будет выводиться из организма. Липид или лиганд на основе липида, который связывается с HSA менее сильно, можно использовать для нацеливания конъюгата в почку.

В некоторых вариантах осуществления лиганд на основе липидов связывает HSA. Предпочтительно, он связывает HSA с достаточной аффинностью, чтобы конъюгат предпочтительно распределялся в ткань, не являющуюся тканью почки. Однако предпочтительно, чтобы аффинность не была настолько высокой, чтобы связывание HSA-лиганд было необратимым.

В других вариантах осуществления лиганд на основе липида связывает HSA слабо или совсем не связывает, так что конъюгат предпочтительно распределяется в почку. Другие фрагменты, которые нацеливаются на клетки почки, также можно использовать вместо или в дополнение к лиганду на основе липидов.

В другом аспекте лиганд представляет собой фрагмент, например, витамин, которая захватывается клеткой-мишенью, например, пролиферирующей клеткой. Он является особенно пригодным для лечения расстройств, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например, злокачественного или незлокачественного типа, например, злокачественных клеток. Иллюстративные витамины включают витамин А, Е и К. Другие иллюстративные витамины представляют собой витамин В, например, фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль или другие витамины или питательные вещества, захватываемые клетками-мишенями, такими как клетки печени. Также включены HSA и липопротеин низкой плотности (LDL).

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

В другом аспекте лиганд представляет собой средство, обеспечивающее проникновение в клетку, предпочтительно средство, обеспечивающее проникновение в клетку со спиральной структурой. Предпочтительно, средство является амфипатическим. Иллюстративное средство представляет собой пептид, такой как tat или antennopedia. Если средство представляет собой пептид, он может быть модифицированным, включая пептидилмиметик, инвертомеры, непептидные или псевдопептидные связи и использование D-аминокислот. Средство со спиральной структурой предпочтительно представляет собой средство с альфа-спиральной структурой, которое предпочтительно

имеет липофильную и липофобную фазу.

Лиганд может представлять собой пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также обозначаемый в настоящем описании как олигопептидомиметик) представляет собой молекулу, способную укладываться в определенную трехмерную структуру, сходную с природным пептидом. Связывание пептида и пептидомиметика с агентами иРНК может повлиять на фармакокинетическое распределение иРНК, например, путем усиления клеточного распознавания и абсорбции. Длина пептидного фрагмента или пептидомиметика может составлять примерно 5-50 аминокислот, например, длину примерно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

Пептид или пептидомиметик может представлять собой, например, пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, катионный пептид, амфипатические пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий в основном из Tyr, Trp или Phe). Пептидный фрагмент может представлять собой пептид-дендример, скрепленный пептид или перекрестно-сшитый пептид. В другом альтернативном варианте пептидный фрагмент может включать последовательность для переноса через гидрофобную мембрану (MTS). Иллюстративный гидрофобный MTS-содержащий пептид представляет собой RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO:18). Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO:19), содержащий гидрофобную MTS, также может представлять собой нацеливающий фрагмент. Пептидный фрагмент может представлять собой “доставляющий” пептид, который может переносить большие полярные молекулы, включая пептиды, олигонуклеотиды и белок, через клеточные мембраны. Например, было выявлено, что последовательности из белка Tat ВИЧ (GRKKRRQRRPPQ (SEQ ID NO:20) и белка *Drosophila Antennapedia* (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:21) способны функционировать в качестве доставляющих пептидов. Пептид или пептидомиметик, могут кодироваться случайной последовательностью ДНК, такой как пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея или комбинаторной библиотеки одна гранула-одно соединение (OBOC) (Lam *et al.*, Nature, 354:82-84, 1991). Примерами пептида или пептидомиметика, связанных с агентом дцРНК посредством введенной мономерной единицы для целей нацеливания на клетку, являются пептид аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD) или миметик RGD. Длина пептидного фрагмента может находиться в диапазоне от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут иметь структурную модификацию, такую как модификация для повышения стабильности или обеспечения конформационных свойств. Можно использовать любую из структурных модификаций, описанных ниже.

Пептид RGD для применения в композициях и способах по изобретению может быть линейным или циклическим, и может быть модифицированным, например, гликозилированным или метилированным, для облегчения нацеливания на конкретную ткань(и). RGD-содержащие пептиды и пептидомиметики могут включать D-аминокислоты, также как и синтетические миметики RGD. В дополнение к RGD, можно использовать

другие фрагменты, которые нацелены на лиганд-интегрин. Предпочтительные конъюгаты этого лиганда нацелены на PECAM-1 или VEGF.

"Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку," способен проникать в клетку, например, микробную клетку, такую как бактериальная клетка или клетка грибов, или клетку млекопитающих, такую как клетка человека. Микробный пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, может представлять собой, например,  $\alpha$ -спиральный линейный пептид (например, LL-37 или Seropin PI), содержащий дисульфидную связь пептид (например,  $\alpha$ -дефензин,  $\beta$ -дефензин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две доминирующих аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, также может включать клеточный сигнал внутриядерной локализации (NLS). Например, пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, может представлять собой двухкомпонентный амфипатический пептид, такой как MPG, который получен из домена пептид слияния gp41 ВИЧ-1 и NLS из большого Т-антигена SV40 (Simeoni *et al.*, Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

### С. Углеводные конъюгаты

В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по изобретению иРНК дополнительно содержит углевод. Конъюгированные с углеводом иРНК являются преимущественными для доставки нуклеиновых кислот *in vivo*, а также в качестве композиций, пригодных для терапевтического применения *in vivo*, как описано в настоящем документе. Как используют в рамках изобретения, "углевод" относится к соединению, которое представляет собой либо непосредственно углевод, состоящий из одного или нескольких моносахаридных звеньев, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (которые может быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода; или к соединению, имеющему в качестве его части углеводный фрагмент, состоящий из одного или нескольких моносахаридных звеньев, каждый из которых имеет по меньшей мере шесть атомов углерода (которые может быть линейными, разветвленными или циклическими), с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Репрезентативные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие примерно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных звеньев), и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные камеди. Конкретные моносахариды включают сахара C5 и выше (например, C5, C6, C7 или C8); ди- и трисахариды включают сахара, имеющие два или три моносахаридных звеньев (например, C5, C6, C7 или C8).

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

В некоторых вариантах осуществления моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин (GalNAc). Конъюгаты GalNAc, которые содержат одно или несколько производных N-ацетилгалактозамина (GalNAc), описаны, например, в патенте США No. US 8106022, полное содержание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления конъюгат GalNAc служит лигандом, который

направляет иРНК к определенным клеткам. В некоторых вариантах осуществления конъюгат GalNAc направляет иРНК к клеткам печени, например, выступая в качестве лиганда для асиалогликопротеинового рецептора клеток печени (например, гепатоцитов).

В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат содержит одно или несколько производных GalNAc. Производные GalNAc могут быть присоединены через линкер, например, двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер. В некоторых вариантах осуществления конъюгат GalNAc конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления конъюгат GalNAc конъюгирован с агентом иРНК (например, с 3'-концом смысловой цепи) через линкер, например, линкер, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления конъюгат GalNAc конъюгирован с 5'-концом смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления конъюгат GalNAc конъюгирован с агентом иРНК (например, с 5'-концом смысловой цепи) через линкер, например, линкер, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к агенту иРНК по изобретению через моновалентный линкер. В некоторых вариантах осуществления GalNAc или производное GalNAc присоединены к агенту иРНК по изобретению через двухвалентный линкер. В других вариантах осуществления изобретения, GalNAc или производное GalNAc присоединены к агенту иРНК по изобретению через трехвалентный линкер. В других вариантах осуществления изобретения, GalNAc или производное GalNAc присоединены к агенту иРНК по изобретению через четырехвалентный линкер.

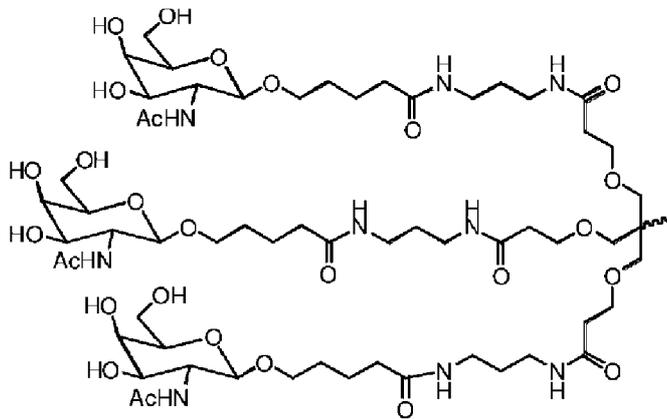
В некоторых вариантах осуществления агенты двухцепочечной РНКи по изобретению содержат один GalNAc или производное GalNAc, присоединенное к агенту иРНК. В некоторых вариантах осуществления агенты двухцепочечной РНКи по изобретению содержат множество (например, 2, 3, 4, 5 или 6) GalNAc или производных GalNAc, каждое из которых независимо присоединено к множеству нуклеотидов агента двухцепочечной РНКи через множество одновалентных линкеров.

В некоторых вариантах осуществления, например, когда две цепи агента иРНК по изобретению являются частью одной большей молекулы, соединенной непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образуя петлю-шпильку, содержащую множество неспаренных нуклеотидов, причем каждый неспаренный нуклеотид в петле-шпильке может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенное через моновалентный линкер. Петля-шпилька также может быть образована удлиненным выступающим концом на одной цепи дуплекса.

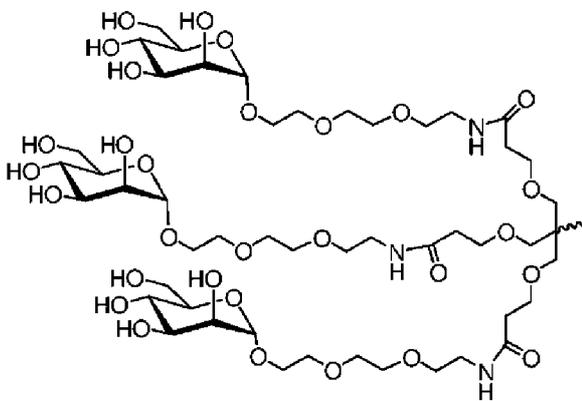
В некоторых вариантах осуществления, например, когда две цепи агента иРНК по изобретению являются частью одной большей молекулы, соединенной непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образуя петлю-шпильку, содержащую множество неспаренных нуклеотидов, причем каждый неспаренный нуклеотид в петле-шпильке может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенное через моновалентный линкер. Петля-шпилька также

может быть образована удлиненным выступающим концом на одной цепи дуплекса.

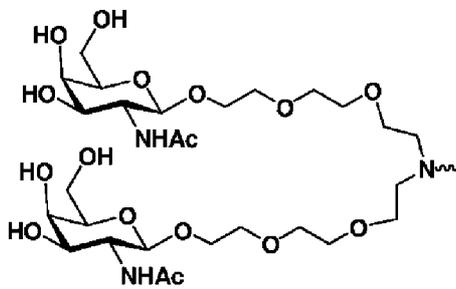
В одном варианте осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах по изобретению выбран из группы, состоящей из:



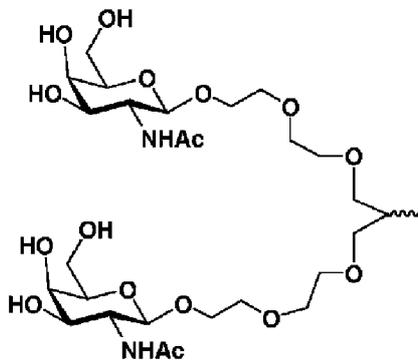
Формула II,



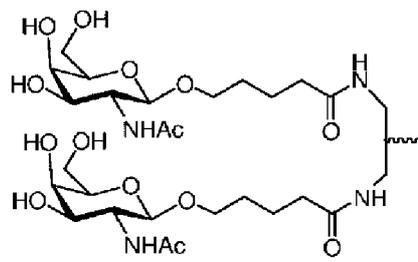
Формула III,



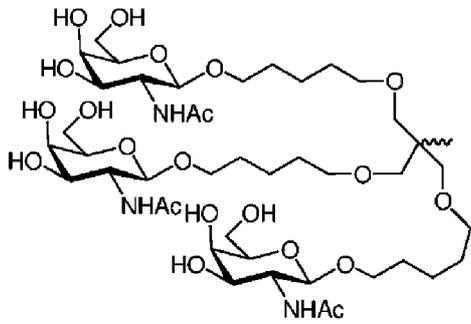
Формула IV,



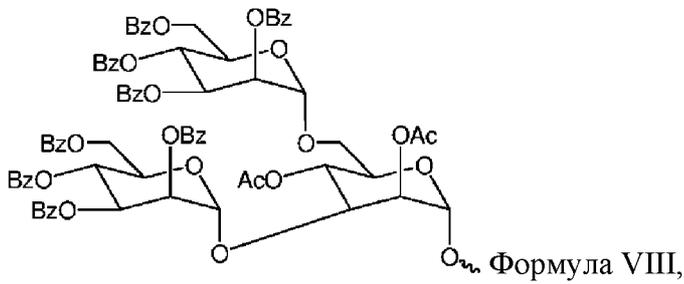
Формула V,



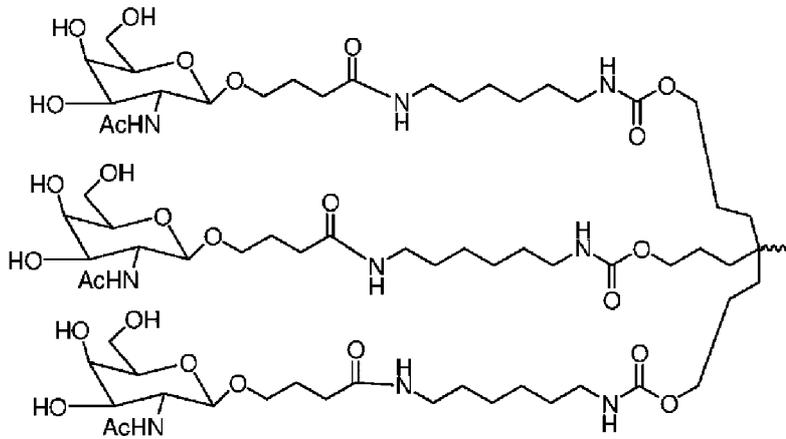
Формула VI,



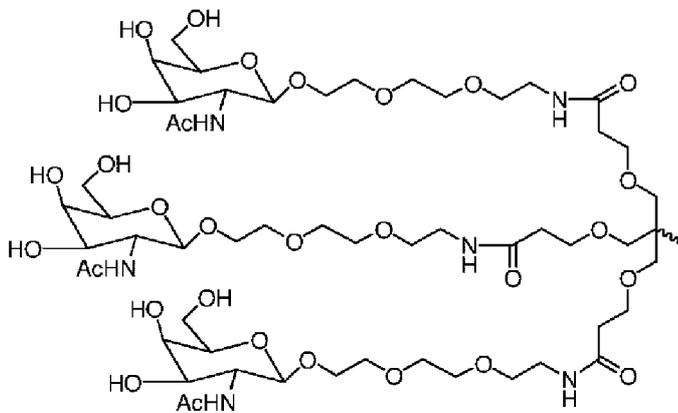
Формула VII,



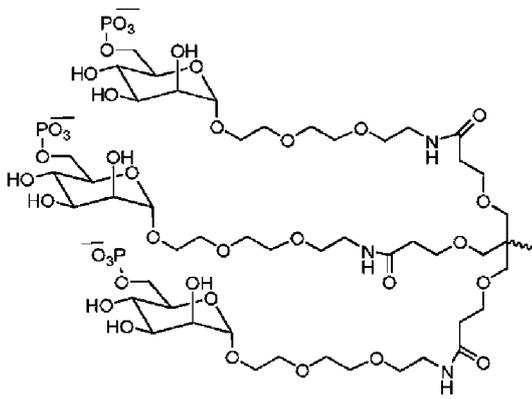
Формула VIII,



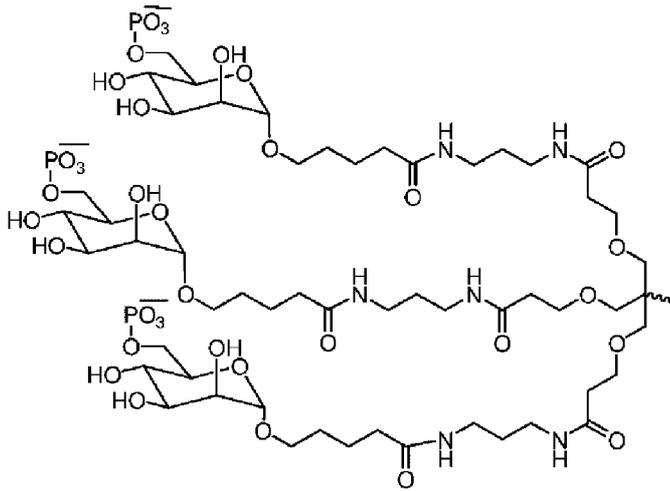
Формула IX,



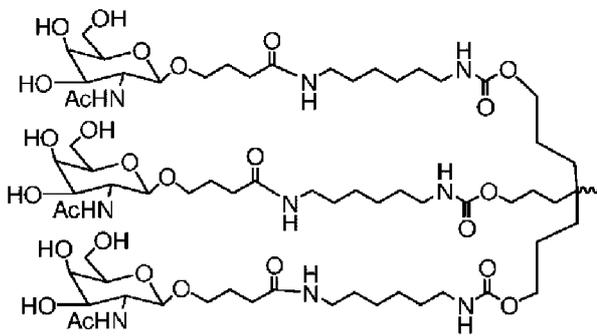
Формула X,



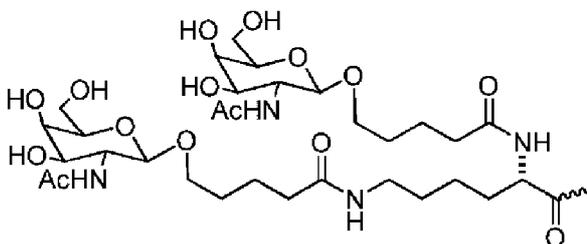
Формула XI,



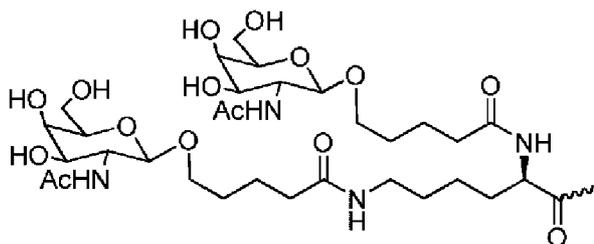
Формула XII,



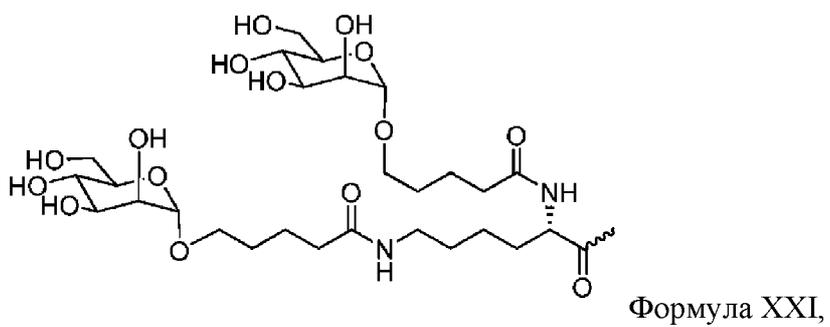
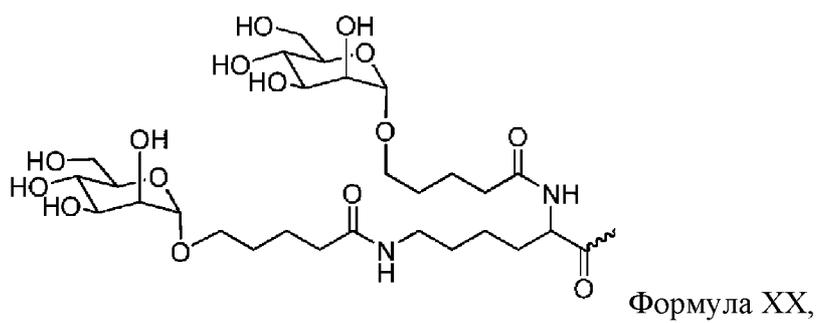
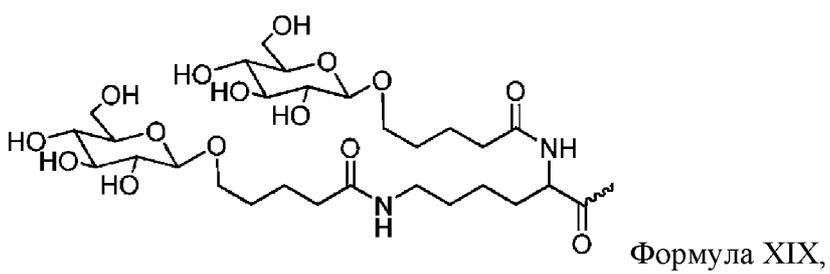
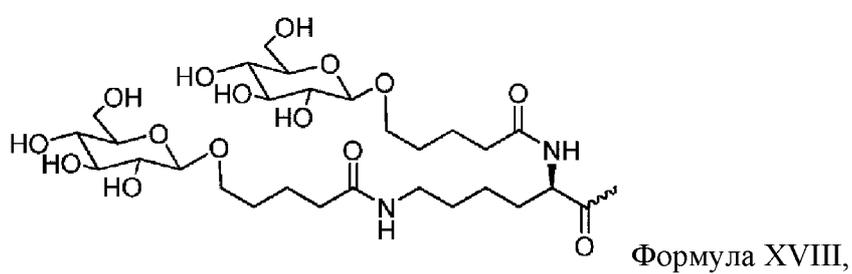
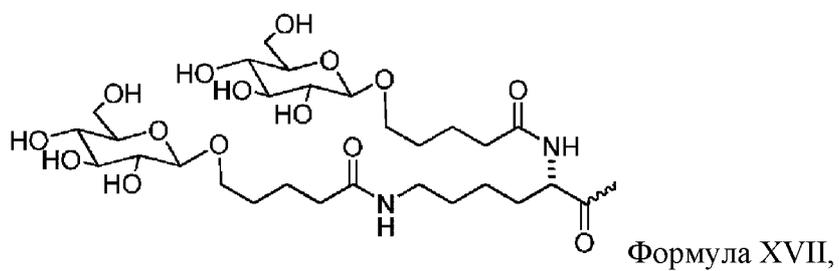
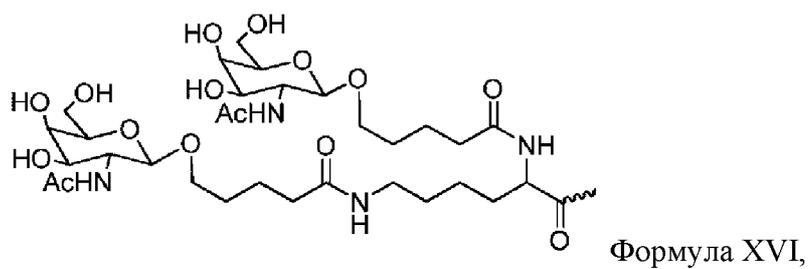
Формула XIII,

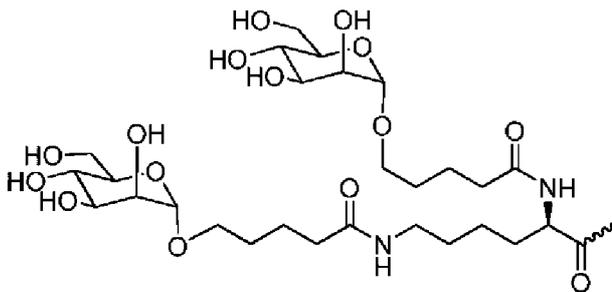


Формула XIV,

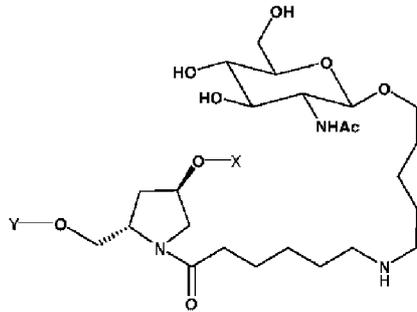


Формула XV,

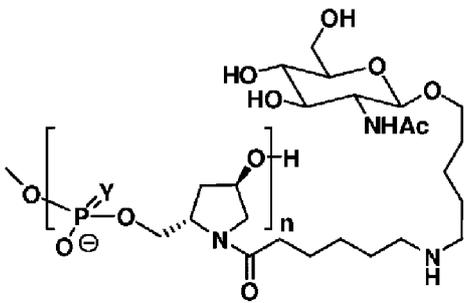




Формула XXII,

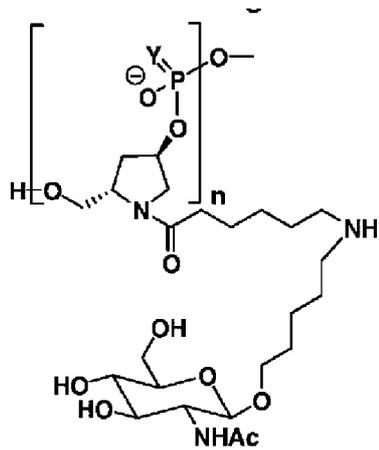


Формула XXIII;



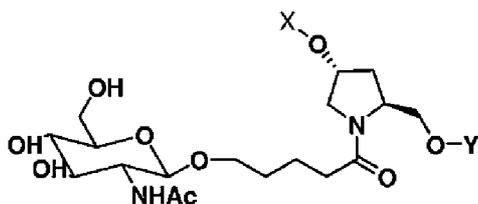
, где Y представляет собой O или S и n равно 3-6

(формула XXIV);



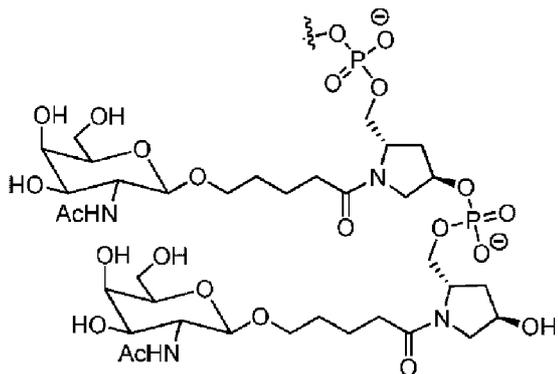
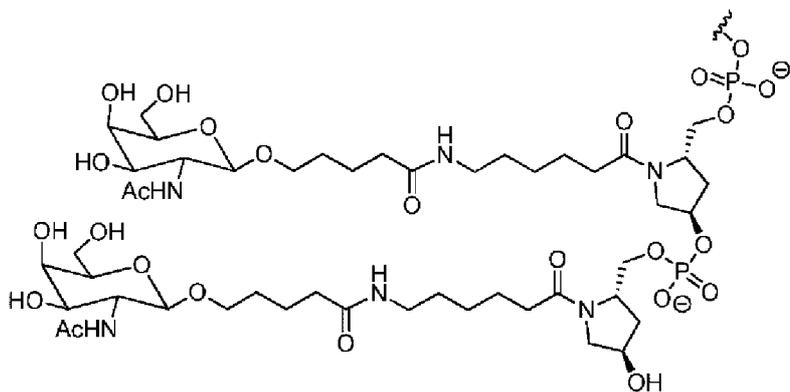
, где Y представляет собой O или S и n равно 3-6

(Формула XXV);



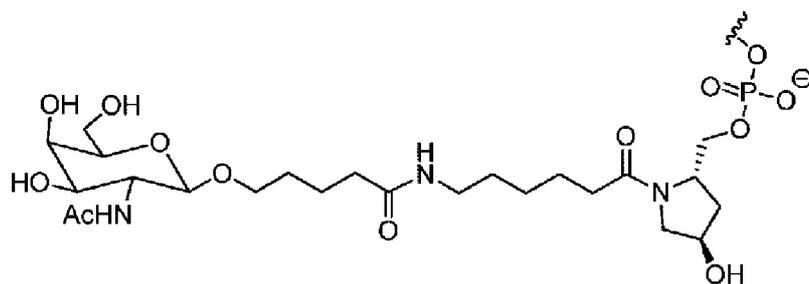
Формула XXVI;



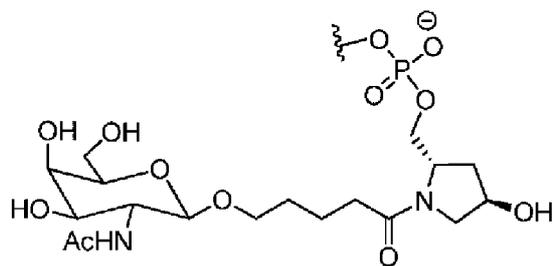


Формула XXX;

Формула XXXI;

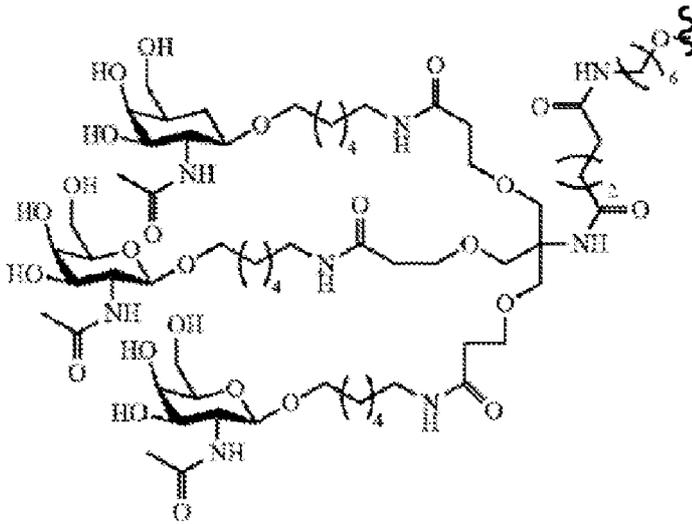


и



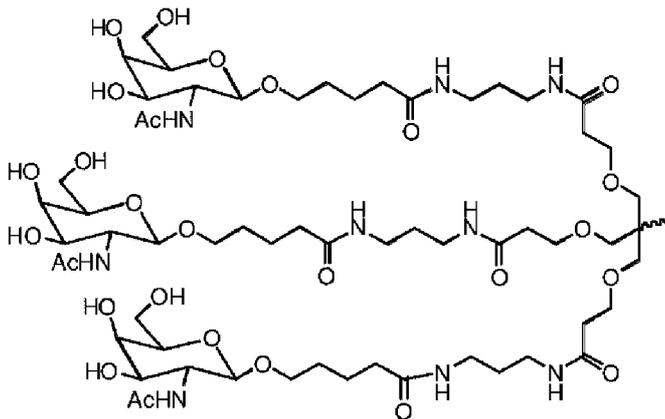
Формула XXXII;

Формула XXXIII.



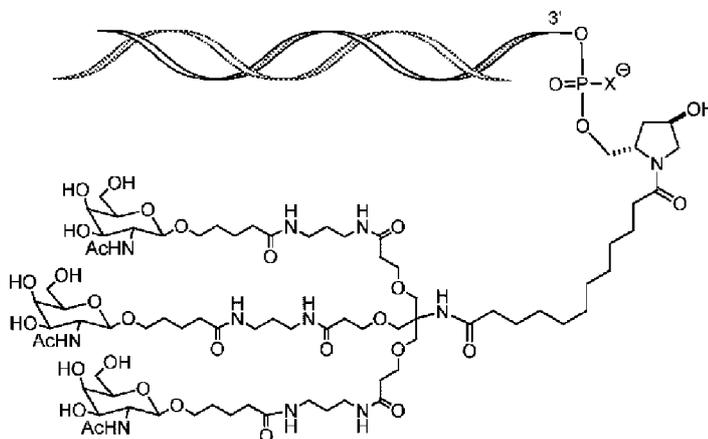
Формула XXXIV.

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

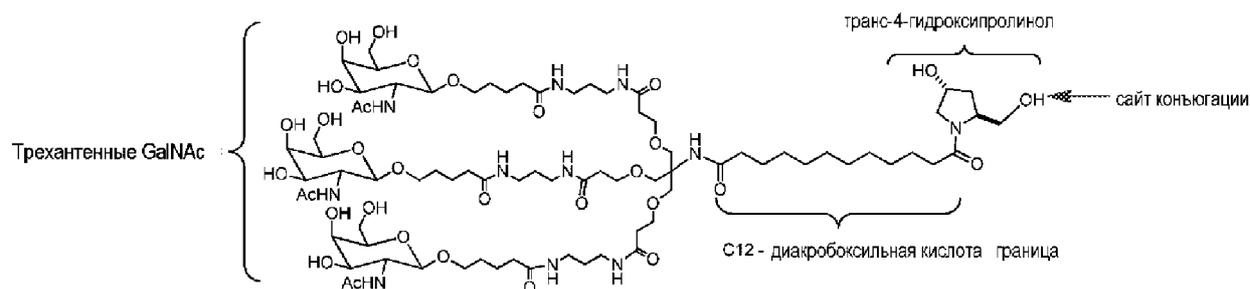


Формула II.

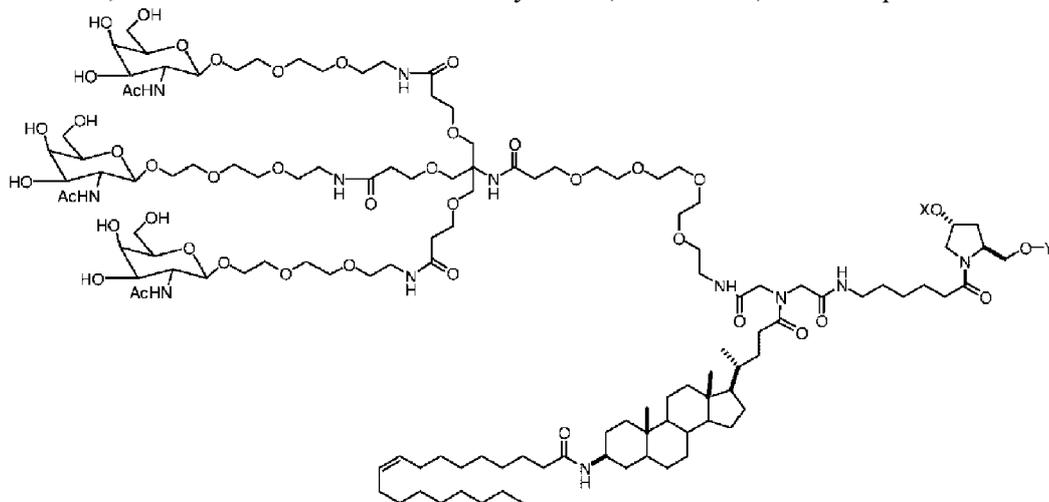
В некоторых вариантах осуществления агент РНКи присоединен к углеводному конъюгату через линкер, как показано на следующей схеме, где X представляет собой O или S



В некоторых вариантах осуществления агент РНКи конъюгирован с L96, как определено в таблице 1 и показано ниже:

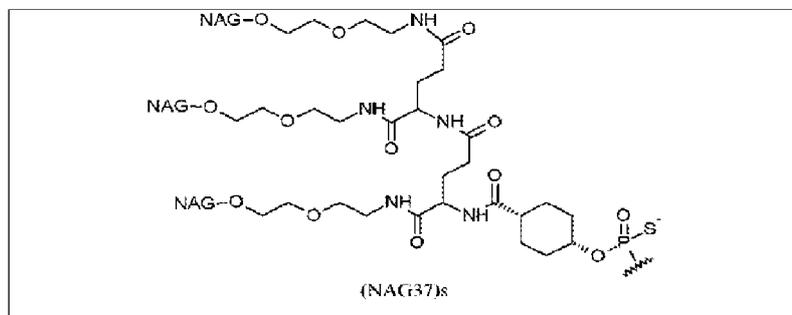


Другой репрезентативный углеводный конъюгат для применения в вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, включает, но не ограничивается этим,



(Формула XXXVI), когда один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления подходящий лиганд представляет собой лиганд, описанный в WO 2019/055633, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления лиганд включает структуру ниже:



В некоторых вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к агенту иРНК по изобретению через моновалентный линкер. В некоторых вариантах осуществления GalNAc или производное GalNAc присоединены к агенту иРНК по изобретению через двухвалентный линкер. В других вариантах

осуществления изобретения, GalNAc или производное GalNAc присоединены к агенту иРНК по изобретению через трехвалентный линкер.

В одном варианте осуществления агенты двухцепочечной РНКи по изобретению содержат один или несколько GalNAc или производных GalNAc, присоединенных к агенту иРНК. GalNAc может быть присоединен к любому нуклеотиду через линкер на смысловой или антисмысловой цепи. GalNAc может быть присоединен к 5'-концу смысловой цепи, 3'-концу смысловой цепи, 5'-концу антисмысловой цепи или 3'-концу антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления GalNAc присоединен к 3'-концевой смысловой цепи, например, через трехвалентный линкер.

В других вариантах осуществления агенты двухцепочечной РНКи по изобретению содержат множество (например, 2, 3, 4, 5 или 6) GalNAc или производных GalNAc, каждое из которых независимо присоединено к множеству нуклеотидов агента двухцепочечной РНКи посредством множества линкеров, например, моновалентных линкеров.

В некоторых вариантах осуществления, например, когда две цепи агента иРНК по изобретению являются частью одной более крупной молекулы, соединенной непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образуя петлю-шпильку, содержащую множество неспаренных нуклеотидов, причем каждый неспаренный нуклеотид в петле-шпильке может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенное посредством моновалентного линкера.

В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат дополнительно содержит один или несколько дополнительных лигандов, как описано выше, таких как, но не ограничиваясь ими, модулятор РК или проникающий в клетку пептид.

Дополнительные углеводные конъюгаты и линкеры, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают такие, как описанные в публикациях РСТ No. WO 2014/179620 и WO 2014/179627, полное содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

#### *D. Линкеры*

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

Термин "линкер" или "линкерная группа" означает органическую часть, которая соединяет две части соединения, например, ковалентно связывает две части соединения. Линкеры, как правило, содержат прямую связь или атом, такой как кислород или сера, элемент, такой как NR<sub>8</sub>, C(O), C(O)NH, SO, SO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>NH или цепь атомов, такую как, но не ограничиваясь ими, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил,

алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил, алкинилгетероциклилалкил, алкинилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, алкинилгетероарил, причем один или несколько метиленов могут прерываться или оканчиваться O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R<sub>8</sub>), C(O), замещенным или незамещенным арилом, замещенным или незамещенным гетероарилом, замещенным или незамещенным гетероциклическим соединением; где R<sub>8</sub> представляет собой водород, ацил, алифатическую группу или замещенную алифатическую. В одном варианте осуществления линкер имеет приблизительно 1-24 атома, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18, 7-17, 8-17, 6-16, 7-17 или 8-16 атомов.

Расщепляемая линкерная группа представляет собой группу, которая является достаточно стабильной вне клетки, но которая при проникновении в клетку-мишень расщепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживал вместе. В предпочтительном варианте осуществления расщепляемая линкерная группа расщепляется по меньшей мере приблизительно в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или более, или по меньшей мере приблизительно в 100 раз быстрее в клетке-мишени или в первых эталонных условиях (которые, например, могут быть выбраны так, чтобы они имитировали или отражали внутриклеточные условия), чем в крови индивидуума, или во вторых эталонных условиях (которые, например, могут быть выбраны так, чтобы они имитировали или отражали условия, встречающиеся в крови или сыворотке).

Расщепляемые линкерные группы являются чувствительными к расщепляющим агентам, например, pH, окислительно-восстановительный потенциал или присутствие расщепляющих молекул. Как правило, расщепляющие агенты являются более распространенными или встречаются при более высоких уровнях или с более высокой активностью в клетках, чем в сыворотке или в крови. Примеры таких расщепляющих агентов включают: окислительно-восстановительные агенты, которые выбраны для конкретных субстратов или которые не обладают субстратной специфичностью, включая, например, окислительные или восстановительные ферменты или восстановительные агенты, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут расщеплять окислительно-восстановительную линкерную группу путем восстановления; эстеразы; эндосомы или средства, которые могут создавать кислую среду, например, средства, которые обеспечивают значение pH, равное пяти или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или деградировать расщепляемую кислотой линкерную группу путем действия в качестве обычной кислоты, пептидазы (которые могут быть специфичными к субстрату) и фосфатазы.

Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть чувствительной к рН. рН сыворотки человека составляет 7,4, в то время как среднее внутриклеточное значение рН является несколько более низким, находясь в диапазоне приблизительно 7,1-7,3. Эндосомы имеют более кислое значение рН в диапазоне 5,5-6,0, и лизосомы имеют еще более кислое значение рН на уровне приблизительно 5,0. Некоторые линкеры имеют расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется при предпочтительном значении рН, тем самым, освобождая катионный липид от лиганда внутри клетки, или в желаемом компартменте клетки.

Линкер может включать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется конкретным ферментом. Тип расщепляемой линкерной группы, включенной в линкер, может зависеть от клетки, на которую осуществляют нацеливание. Например, нацеливающий в печень лиганд может быть связан с катионным липидом через линкер, который включает сложноэфирную группу. Клетки печени обогащены эстеразами, и, таким образом, линкер более эффективно расщепляется в клетках печени, чем в типах клеток, которые не обогащены эстеразой. Другие типы клеток, обогащенные эстеразами, включают клетки легкого, коры почки и семенников.

Линкеры, которые содержат пептидные связи, можно использовать при нацеливании на типы клеток, обогащенные пептидазами, такие как клетки печени и синовиоциты.

Как правило, пригодность являющейся кандидатом расщепляемой линкерной группы можно оценивать путем исследования способности расщепляющего агента (или условий) расщеплять являющуюся кандидатом линкерную группу. Также является желательным исследование являющейся кандидатом расщепляемой линкерной группы в отношении способности не поддаваться расщеплению в крови и при контакте с другой не являющейся мишенью тканью. Таким образом, можно определить относительную чувствительность к расщеплению между первым и вторыми условиями, где первые условия выбраны так, чтобы они указывали на расщепление в клетке-мишени, а вторые условия выбраны так, чтобы они указывали на расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например, крови или сыворотке. Оценку можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в клеточной культуре, в культуре органа или ткани, или у животных целиком. Может быть пригодным проведение первоначальной оценки в бесклеточных условиях или условиях культивирования и подтверждение посредством дальнейшей оценки у животных целиком. В предпочтительных вариантах осуществления пригодные соединения-кандидаты расщепляются по меньшей мере приблизительно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или приблизительно в 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных так, чтобы они имитировали внутриклеточные условия) по сравнению с кровью или сывороткой (или в условиях *in vitro*, выбранных так, чтобы они имитировали внеклеточные условия).

#### i. Расщепляемые в условиях восстановления-окисления линкерные группы

В некоторых вариантах осуществления расщепляемая линкерная группа представляет собой расщепляемую в условиях восстановления-окисления линкерную

группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером расщепляемой в условиях восстановления линкерной группы является дисульфидная линкерная группа (-S-S-). Для определения того, является ли являющаяся кандидатом расщепляемая линкерная группа пригодной "расщепляемой в условиях восстановления линкерной группой", или, например, является ли она пригодной для применения с конкретным фрагментом иРНК и конкретным нацеливающим агентом, можно использовать способы, описанные в настоящем описании. Например, кандидата можно оценивать посредством инкубации с дитиотреитолом (DTT), или другим восстановителем с использованием реагентов, известных в данной области, которые имитируют скорость расщепления, которая наблюдается в клетке, например, в клетке-мишени. Кандидатов также можно оценивать в условиях, которые выбраны так, чтобы имитировать условия в крови или сыворотке. В одном варианте осуществления соединения-кандидаты расщепляются не более чем на 10% в крови. В других вариантах осуществления пригодные соединения-кандидаты расщепляются по меньшей мере приблизительно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или приблизительно в 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных так, чтобы имитировать внутриклеточные условия) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных так, чтобы они имитировали внеклеточные условия). Скорость расщепления соединений-кандидатов можно определять с использованием стандартных ферментных анализов кинетики в условиях, выбранных так, чтобы они имитировали внутриклеточную среду, и сравнивать с условиями, выбранными так, чтобы они имитировали внеклеточную среду.

#### *ii.* Расщепляемые линкерные группы на основе фосфата

В других вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую линкерную группу на основе фосфата. Расщепляемая линкерная группа на основе фосфата расщепляется средствами, которые деградируют или гидролизуют фосфатную группу. Примером средства, который расщепляет фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как фосфатазы, в клетках. Примерами линкерных групп на основе фосфата являются -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)( Rk)-S-. Предпочтительными вариантами осуществления являются -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S- и -O-P(S)(H)-S-. Предпочтительным вариантом осуществления является -O-P(O)(OH)-O-. Этих кандидатов можно оценивать с использованием способов, аналогичных способам, описанным выше.

#### *iii.* Расщепляемые кислотой линкерные группы

В других вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую кислотой линкерную группу. Расщепляемая кислотой линкерная группа представляет собой линкерную группу, которая расщепляется в кислых условиях. В предпочтительных

вариантах осуществления расщепляемые кислотой линкерные группы расщепляются в кислой среде с рН приблизительно 6,5 или ниже (например, приблизительно 6,0, 5,5, 5,0 или ниже), или средствами, такими как ферменты, которые могут действовать как обычная кислота. В клетке определенные органеллы с низким значением рН, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечить условия расщепления для расщепляемых кислотой линкерных групп. Примеры расщепляемых кислотой линкерных групп включают, но не ограничиваются ими, гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Расщепляемые кислотой группы могут иметь общую формулу  $-C=NN-$ ,  $C(O)O$  или  $-OC(O)$ . Предпочтительным вариантом осуществления является вариант осуществления, где атом углерода, связанный с кислородом сложного эфира (алкоксигруппа), представляет собой арильную группу, замещенную алкильную группу или третичную алкильную группу, такую как диметилпентил или трет-бутил. Эти кандидаты можно оценивать с использованием способов, аналогичных способам, описанным выше.

#### *iv.* Линкерные группы на основе сложного эфира

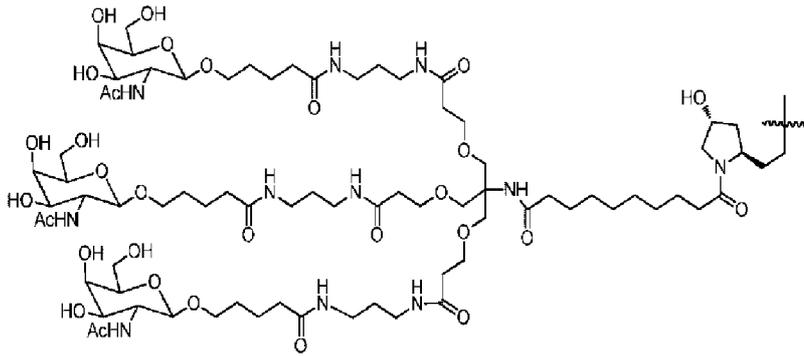
В других вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую линкерную группу на основе сложного эфира. Расщепляемая линкерная группа на основе сложного эфира расщепляется ферментами, такими как эстеразы и амидазы, в клетках. Примеры расщепляемых линкерных групп на основе сложного эфира включают, но не ограничиваются ими, сложные эфиры алкиленовой, алкениленовой и алкиниленовой групп. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы имеют общую формулу  $-C(O)O-$  или  $-OC(O)-$ . Эти кандидаты можно оценивать с использованием способов, аналогичных способам, описанным выше.

#### *v.* Расщепляемые группы на основе пептидов

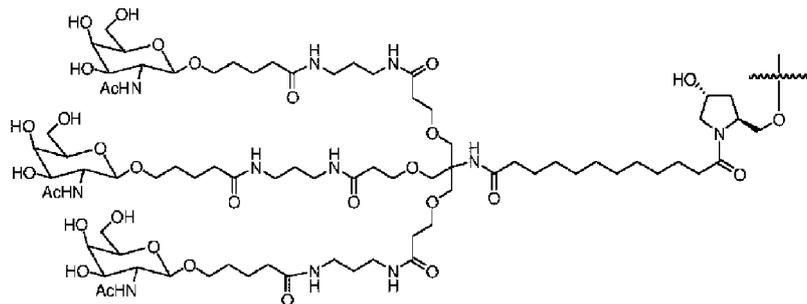
В других вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую линкерную группу на основе пептида. Расщепляемая линкерная группа на основе пептида расщепляется ферментами, такими как пептидазы и протеазы, в клетках. Линкерные группы на основе пептидов представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами, с образованием олигопептидов (например, дипептиды, трипептиды и т.д.) и полипептидов. Расщепляемые группы на основе пептидов не включают амидную группу ( $-C(O)NH-$ ). Амидная группа может быть образована между любым алкиленом, алкениленом или алкиниленом. Пептидная связь представляет собой определенный тип амидной связи, образованный между аминокислотами, с образованием пептидов и белков. Расщепляемая группа на основе пептида обычно ограничивается пептидной связью (т.е. амидная связь), образованной между аминокислотами, с образованием пептидов и белков, и она не включает полную амидную функциональную группу. Расщепляемые линкерные группы на основе пептида имеют общую формулу  $-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-$ , где RA и RB представляют собой группы R двух соседних аминокислот. Эти кандидаты можно оценивать с использованием способов, аналогичных способам, описанным выше.

В некоторых вариантах осуществления иРНК по изобретению конъюгирована с углеводом через линкер. Неограничивающие примеры конъюгатов иРНК с углеводами с

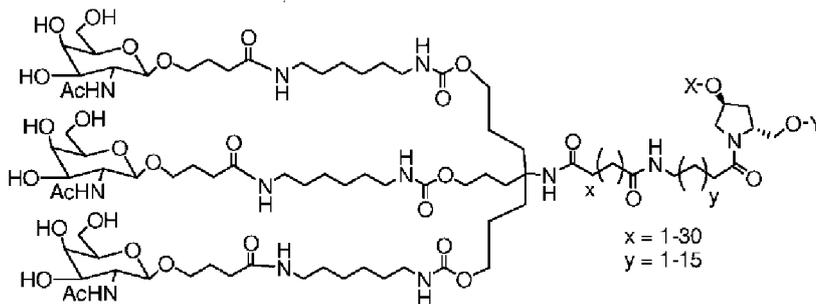
линкерами композиций и способов по изобретению включают, но не ограничиваются ими,



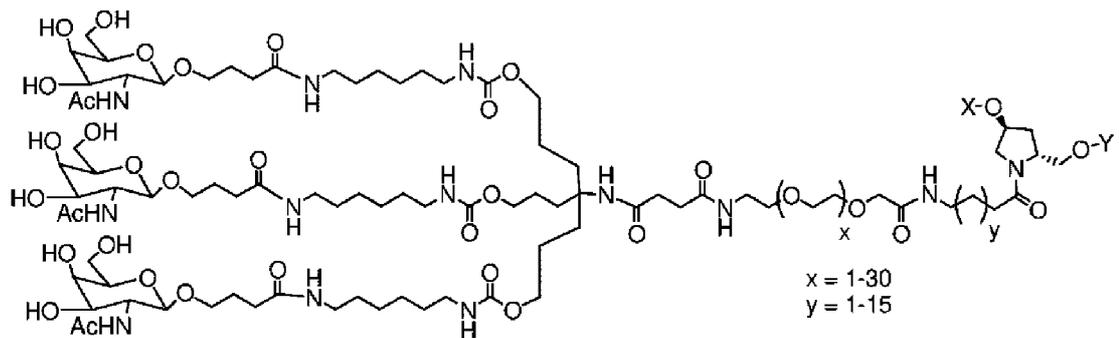
(Формула XXXVII),



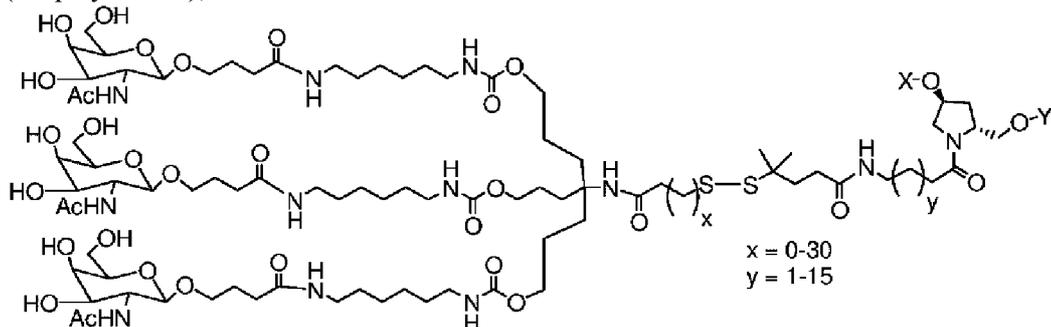
(Формула XXXVIII),



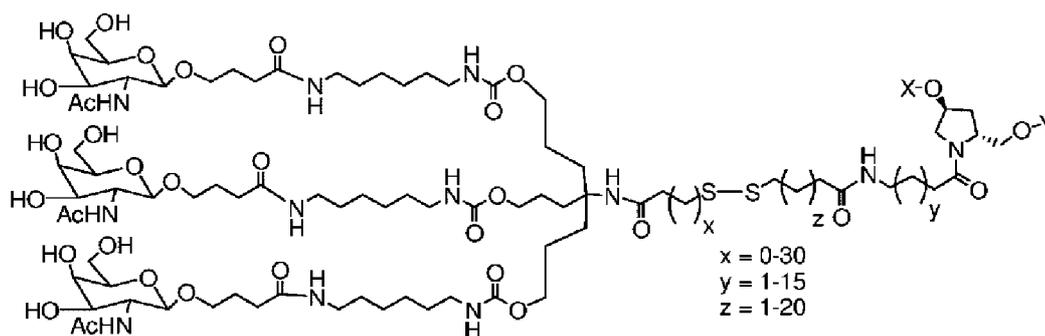
(Формула XXXIX),



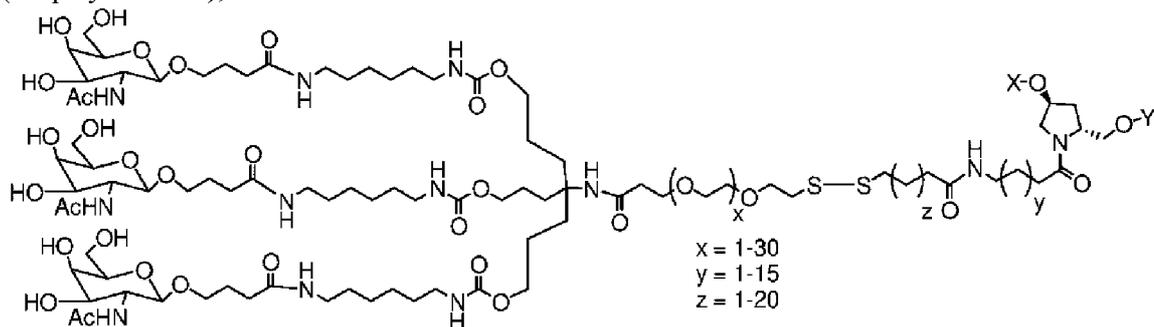
(Формула XL),



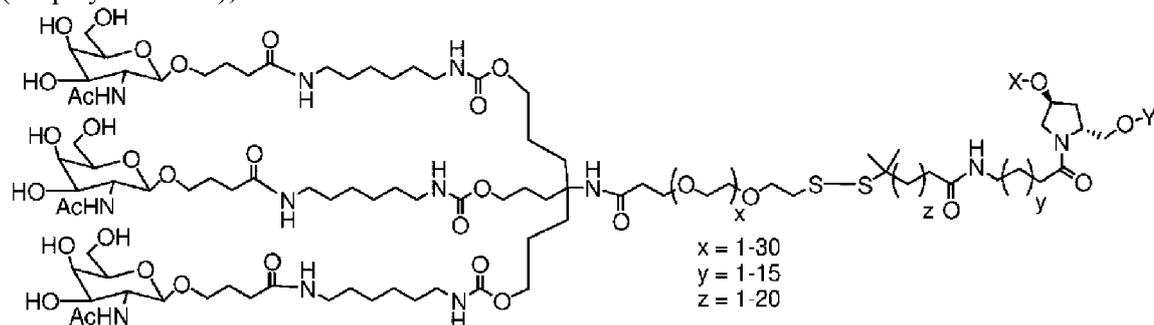
(Формула XLI),



(Формула XLII),



(Формула XLIII), и

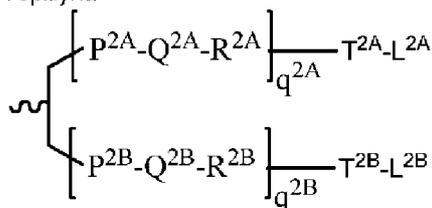


(Формула XLIV), когда один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

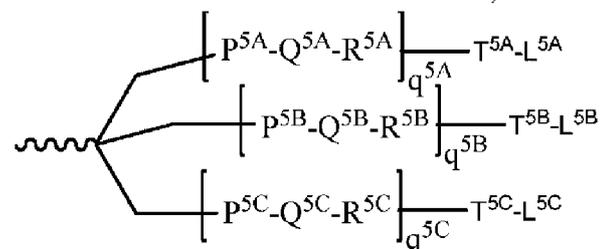
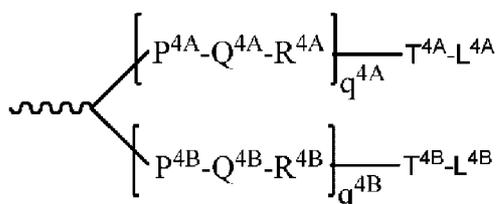
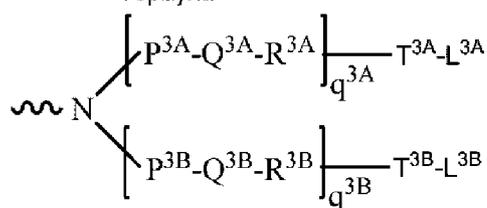
В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по изобретению лиганд представляет собой одно или несколько производных «GalNAc» (N-ацетилгалактозамин), присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

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

Формула XXXXV



Формула XLVI



Формула XLVII

Формула XLVIII

где:

$q^{2\text{A}}$ ,  $q^{2\text{B}}$ ,  $q^{3\text{A}}$ ,  $q^{3\text{B}}$ ,  $q^{4\text{A}}$ ,  $q^{4\text{B}}$ ,  $q^{5\text{A}}$ ,  $q^{5\text{B}}$  и  $q^{5\text{C}}$  представляют собой независимо для каждого случая 0-20, и где повторяющаяся единица может быть одинаковой или разной;

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

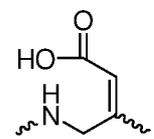
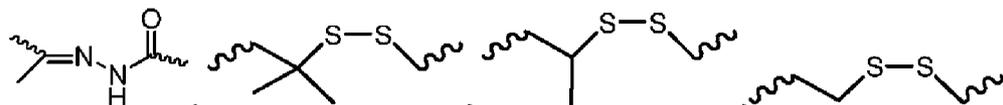
$\text{Q}^{2\text{A}}$ ,  $\text{Q}^{2\text{B}}$ ,  $\text{Q}^{3\text{A}}$ ,  $\text{Q}^{3\text{B}}$ ,  $\text{Q}^{4\text{A}}$ ,  $\text{Q}^{4\text{B}}$ ,  $\text{Q}^{5\text{A}}$ ,  $\text{Q}^{5\text{B}}$ ,  $\text{Q}^{5\text{C}}$  независимо в каждом случае, отсутствует, является алкиленом, замещенным алкиленом, где один или более метиленов могут быть прерваны или закончены одним или более из O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R<sup>N</sup>), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

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

CH(R<sup>a</sup>)-NH-,

CO,

CH=N-O,



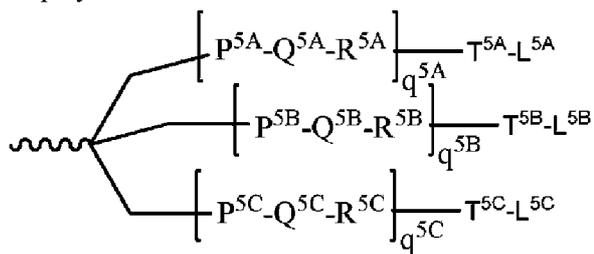
или

гетероцикл;

$\text{L}^{2\text{A}}$ ,  $\text{L}^{2\text{B}}$ ,  $\text{L}^{3\text{A}}$ ,  $\text{L}^{3\text{B}}$ ,  $\text{L}^{4\text{A}}$ ,  $\text{L}^{4\text{B}}$ ,  $\text{L}^{5\text{A}}$ ,  $\text{L}^{5\text{B}}$  и  $\text{L}^{5\text{C}}$  представляют собой лиганд; т.е. каждый независимо в каждом случае, представляет собой моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и R<sup>a</sup> представляет собой H или аминокислотную боковую цепь. Трехвалентные конъюгирующие GalNAc производные являются особенно пригодными для применения с агентами РНКи для

ингибирования экспрессии гена-мишени, такими как с формулой (XLIX):

Формула XLIX



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

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

Репрезентативные патенты США, в которых описано получение РНК конъюгатов, включают, но не ограничиваются ими, патенты США No. 4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717, 5580731; 5591584; 5109124; 5118802; 5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5214136; 5082830; 5112963; 5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098; 5371241, 5391723; 5416203, 5451463; 5510475; 5512667; 5,514,785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928; 5688941; 6294664; 6320017; 6576752; 6783931; 6900297; 7037646; и 8106022, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Не обязательно для всех положений в указанном соединении, чтобы они были одинаково модифицированы, и действительно, более одной из приведенных выше модификаций можно вводить в одно соединение или даже в один нуклеозид в иРНК. Настоящее изобретение также включает соединения иРНК, которые являются химерными соединениями.

«Химерные» иРНК соединения, или «химеры», в контексте настоящего изобретения, представляют собой иРНК соединения, в частности агенты дцРНКи, которые содержат две или более химически отличающихся областей, причем каждая получена по меньшей мере из мономерного блока, т.е. нуклеотида в случае дцРНК соединения. Данные иРНК обычно содержат по меньшей мере одну область, в которой РНК химически модифицируют так, чтобы она придавала иРНК повышенную устойчивость к разрушению нуклеазами, повышенное клеточное поглощение или повышенную связывающую способность к нуклеиновой кислоте, являющейся мишенью. Дополнительная область иРНК может служить в качестве субстрата для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. В качестве примера, РНКазы Н представляет собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет РНК цепь РНК:ДНК дуплекса. Активация РНКазы Н, следовательно, приводит в результате к расщеплению РНК-мишени, посредством чего значительно увеличивается эффективность иРНК ингибирования генной экспрессии. Следовательно,

сравнимые результаты можно часто получить с более короткими иРНК при применении химерных дцРНК, по сравнению с фосфоротиоатдезоксидными дцРНК, гибридизующимися с той же областью, являющейся мишенью. Расщепление РНК-мишени можно обычным образом обнаружить с помощью гель-электрофореза и, при необходимости, с помощью методов гибридизации ассоциированных нуклеиновых кислот, известных в данной области.

В некоторых случаях РНК иРНК можно модифицировать нелигандной группой. Ряд нелигандных молекул конъюгировали с иРНК для того, чтобы увеличить активность, улучшить распределение в клетке или клеточное поглощение иРНК, и способы осуществления данных конъюгаций имеются в научной литературе. Данные нелигандные группы включали липидные группы, такие как холестерин (Kubo, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), холевая кислота (Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), тиоэфир, например, берил-S-тримитиол (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), тиохолестерин (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), алифатическую цепь, например, додекандиоловый или ундециловоый остатки (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49), фосфолипид, например, дигексадецил-гас-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-О-гексадецил-гас-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969), или адамантануксусную кислоту (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), пальмитиловую часть (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), или октадециламиновою или гексиламинокарбонилхолестериновую часть (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Репрезентативные патенты США, в которых описано получение данных РНК конъюгатов, перечислены выше. Стандартные способы конъюгирования включают получение РНК, несущих амиолинкер в одном или более положениях последовательности. Затем аминогруппу подвергают взаимодействию с молекулой, которую конъюгируют, используя подходящие конденсирующие или активирующие реагенты. Реакцию конъюгирования можно осуществлять или с РНК, все еще связанной с твердой подложкой, или после отщепления РНК в фазе раствора. Очистка РНК конъюгата ВЭЖХ обычно дает чистый конъюгат.

#### IV. Доставка иРНК по изобретению

Доставку иРНК по настоящему изобретению к клетке, например, клетке субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект, предрасположенный к расстройству, или у которого диагностировано заболевание, ассоциированное с апополипротеином С3, например, гипертриглицеридемия) можно осуществить различными способами. Например, доставку можно осуществлять путем приведения в контакт клетки с иРНК по изобретению либо *in vitro*, либо *in vivo*. Доставку *in vivo* также можно осуществлять непосредственно путем введения композиции, содержащей иРНК, например, дцРНК, субъекту. Альтернативно, доставку *in vivo* можно

осуществлять опосредованно путем введения одного или нескольких векторов, которые кодируют и направляют экспрессию иРНК. Эти альтернативы обсуждаются ниже. Такие альтернативные случаи дополнительно описаны ниже.

В общем, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) может быть адаптирован для использования с иРНК по изобретению (см, например, Akhtar S. and Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 и WO94/02595, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Для доставки *in vivo* факторы, которые необходимо учитывать для доставки молекулы иРНК, включают, например, биологическую стабильность доставляемой молекулы, предотвращение неспецифических эффектов и накопление доставленной молекулы в ткани-мишени. РНК также продемонстрировала успех при локальной доставке в ЦНС путем прямой инъекции (Dorn, G., *et al.* (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH., *et al* (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H., *et al* (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., *et al* (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., *et al* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya, Y., *et al* (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602). Модификация РНК или фармацевтические носители также может обеспечить нацеливание иРНК на ткань-мишень и избежать нежелательных побочных эффектов. Молекулы иРНК могут быть модифицированы путем химической конъюгации с липофильными группами, такими как холестерин, для усиления захвата клетками и предотвращения деградации. Например, иРНК, направленную против АроВ, которая конъюгирована с липофильным фрагментом холестерина, систематически вводили мышам, что приводило к нокдауну мРНК ароВ как в печени, так и в тощей кишке (Soutschek, J., *et al* (2004) *Nature* 432:173-178).

В альтернативном варианте осуществления иРНК может быть доставлена с использованием систем доставки лекарственных средств, таких как наночастицы, дендример, полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки облегчают связывание молекулы иРНК (отрицательно заряженной), а также усиливают взаимодействие на отрицательно заряженной клеточной мембране, обеспечивая эффективное поглощение иРНК клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут либо связываться с иРНК, либо индуцироваться с образованием везикул или мицелл (см, например, Kim SH, *et al* (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), которая заключает в себе иРНК. Образование везикул или мицелл дополнительно предотвращает деградацию иРНК при системном введении. Способы получения и введения катионных комплексов иРНК хорошо известны специалистам в данной области (см, например, Sorensen, DR, *et al* (2003) *J. Mol. Biol* 327:761-766; Verma, UN, *et al* (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS *et al* (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственного средства, пригодных для системной доставки иРНК, включают DOTAP (Sorensen, DR., *et al* (2003), *supra*; Verma, UN, *et al* (2003), *supra*), «твердые липидные частицы нуклеиновой кислоты» (Zimmermann, TS, *et al* (2006) *Nature* 441:111-114), кардиолипид (Chien, PY, *et al*

(2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A, *et al* (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), полиэтиленимин (Bonnet ME, *et al* (2008) *Pharm. Res.* Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 7:1659), Arg-Gly-Asp (RGD) пептиды (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487), и полиамидоамины (Tomalia, DA, *et al* (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., *et al* (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). В некоторых вариантах осуществления иРНК образует комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции иРНК и циклодекстринов можно найти в патенте США No. 7427605, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

#### А. Кодируемые вектором иРНК по изобретению

иРНК, целенаправленно воздействующая на ген аполипопротеина С3, может экспрессироваться единицами транскрипции, встроенных в векторы ДНК или РНК (см., например, Couture, A, *et al.*, *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A, *et al.*, международную публикацию PCT No. WO 00/22113, Congrad, международную публикацию PCT No. WO 00/22114, и Congrad, патент США No. 6054299). Экспрессия может быть временной (порядка от часов до недель) или длительной (от недель до месяцев или дольше), в зависимости от конкретной используемой конструкции и типа ткани или клетки-мишени. Такие трансгены можно вводить в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может быть интегрирующим или неинтегрирующим вектором. Трансген также может быть сконструирован с возможностью наследования их в виде экстрахромосомной плазмиды (Gassmann, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

Системы вирусных векторов, которые можно использовать с описанными в настоящем документе способами и композициями, включают, но не ограничиваются ими, (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, включая, но не ограничиваясь ими, лентивирусные векторы, вирус мышинного лейкоза Молони и т.д.; (c) аденоассоциированные вирусные векторы; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (e) векторы SV 40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) векторы на основе пикорнавируса; (i) векторы на основе поксвируса, такие как ортопокс, например, вектор на основе вируса осповакцины или авипокс, например канарипокс или оспы кур; и (j) хелпер-зависимый или “слабый” аденовирус. Вирусы с дефектными по репликации также могут быть полезными. Различные векторы будут встраиваться или не будут встраиваться в геном клеток. При желании конструкции могут включать последовательности вирусов для трансфекции. Альтернативно, конструкция может быть включена в векторы, способные к эписомальной репликации, например, векторы EPV и EBV. В конструкциях для рекомбинантной экспрессии иРНК как правило будут необходимы регуляторные элементы, например, промоторы, энхансеры и т.п., для обеспечения экспрессии иРНК в клетках-мишенях. Другие аспекты, которые следует учитывать в отношении векторов и конструкций, известны в данной области техники.

#### V. Фармацевтические композиции по изобретению

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают иРНК по изобретению. В одном варианте осуществления в настоящем

документе представлены фармацевтические композиции, содержащие иРНК, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие иРНК, применимы для профилактики или лечения расстройств, связанных с апополипротеином С3, например, гипертриглицеридемии. Такие фармацевтические композиции получают на основе способа доставки. Одним из примеров являются композиции, которые составлены для системного введения путем парентеральной доставки, например, путем подкожной (SC), внутримышечной (IM), или внутривенной (IV) доставки. Фармацевтические композиции по изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена апополипротеина С3.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по изобретению стерильны. В другом варианте осуществления фармацевтические композиции по изобретению являются апирогенными.

Фармацевтические композиции по изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена апополипротеина С3. Как правило, подходящая доза иРНК по изобретению будет составлять в диапазоне от примерно 0,001 до примерно 200,0 миллиграмм на килограмм массы тела реципиента в день, обычно в диапазоне примерно от 1 до 50 мг на килограмм массы тела в день. Как правило, подходящая доза иРНК по изобретению будет находиться в диапазоне от примерно 0,1 мг/кг до примерно 5,0 мг/кг, предпочтительно примерно от 0,3 мг/кг до примерно 3,0 мг/кг. Схема повторных доз может включать введение терапевтического количества иРНК на регулярной основе, например, каждый месяц, один раз каждые 3-6 месяцев или один раз в год. В некоторых вариантах осуществления иРНК вводят примерно от одного раза в месяц до примерно одного раза в шесть месяцев.

После начальной схемы лечения лечение можно проводить реже. Продолжительность лечения может быть определена в зависимости от тяжести заболевания.

В других вариантах осуществления разовая доза фармацевтических композиций может быть длительного действия, так что дозы вводят с интервалами не более 1, 2, 3 или 4 месяцев. В некоторых вариантах осуществления изобретения, разовую дозу фармацевтических композиций по изобретению вводят примерно один раз в месяц. В других вариантах осуществления изобретения, разовую дозу фармацевтических композиций по изобретению вводят один раз в квартал (т.е. примерно каждые три месяца). В других вариантах осуществления изобретения, разовую дозу фармацевтических композиций по изобретению вводят два раза в год (т.е. примерно раз в шесть месяцев).

Специалисту в данной области будет понятно, что определенные факторы могут влиять на дозировку и сроки, необходимые для эффективного лечения субъекта, включая, но не ограничиваясь ими, мутации, присутствующие у субъекта, предшествующее лечение, общее состояние здоровья или возраст субъекта, а также другие присутствующие заболевания. Более того, лечение субъекта профилактически или терапевтически эффективным количеством композиции, в зависимости от ситуации, может включать

однократное лечение или серию периодов лечения.

иРНК может быть доставлена таким образом, чтобы целенаправленно воздействовать на конкретную ткань (например, гепатоциты).

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, растворы, эмульсии и составы, содержащие липосомы. Такие композиции могут быть получены из множества компонентов, которые включают, но не ограничиваются ими, предварительно приготовленные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. Лекарственные формы включают те, которые нацелены на печень.

Фармацевтические составы по настоящему изобретению, которые могут быть представлены в стандартной лекарственной форме, могут быть получены в соответствии с обычными способами, хорошо известными в фармацевтической промышленности. Такие методики включают стадию связывания активных ингредиентов с фармацевтическим носителем (носителями) или наполнителем (наполнителями). Как правило, составы получают путем однородного и тесного связывания активных ингредиентов с жидкими носителями.

#### А. Дополнительные лекарственные формы

##### i. Эмульсии

Композиции настоящего изобретения можно получить и формулировать в виде эмульсий. Эмульсии обычно представляют собой гетерогенные системы одной жидкости, диспергированной в другой в виде капель, обычно превышающих 0,1 мкм в диаметре (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi *et al.*, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Эмульсии часто представляют собой двухфазные системы, содержащие две несмешивающиеся жидкие фазы, равномерно смешанные и диспергированные друг в друге. Как правило, эмульсии могут быть или вариантом вода в масле (w/o), или масло в воде (o/w). Когда водная фаза тонко раздроблена и диспергирована в виде мелких капель в объемной масляной фазе, полученную в результате композицию называют эмульсией масла в воде (w/o). Альтернативно, когда масляная фаза тонко раздроблена и диспергирована в виде мелких капель в объемной водной фазе, полученную в результате композицию называют эмульсией воды в масле (o/w). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты в дополнение к диспергированным фазам, и активное лекарственное средство, которое может присутствовать в виде раствора или в водной фазе, масляной фазе или само в виде отдельной фазы. Фармацевтические эксципиенты, такие как эмульгаторы, стабилизаторы,

красители и антиоксиданты, могут также присутствовать в эмульсиях, по мере необходимости. Фармацевтические эмульсии могут также представлять собой множественные эмульсии, которые состоят более чем из двух фаз, такие как, например, в случае эмульсий масло в воде в масле (o/w/o) и вода в масле в воде (w/o/w). Данные сложные составы часто дают определенные преимущества, которыми не обладают двухфазные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные масляные капли o/w эмульсии окружают небольшие водные капли, составляют w/o/w эмульсию. Аналогично, система масляных капель, покрытых каплями воды, стабилизированная в масляной непрерывной фазе, дает o/w/o эмульсию.

Эмульсии характеризуются совсем малой или отсутствием термодинамической стабильности. Часто, диспергированная или прерывная фаза эмульсии хорошо диспергирована во внешней или непрерывной фазе и сохраняется в данной форме посредством эмульгаторов или вязкости состава. Другие способы стабилизации эмульсий включают использование эмульгаторов, которые могут быть включены в любую фазу эмульсии. Эмульгаторы можно приблизительно разбить на четыре категории: синтетические поверхностно-активные вещества, природные эмульгаторы, абсорбирующие основы и тонкодиспергированные твердые вещества (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как поверхностно-активные агенты, находят широкое применение в составе эмульсий и обсуждаются в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Поверхностно-активные вещества обычно являются амфифильными и содержат гидрофильную и гидрофобную часть. Отношение гидрофильных свойств к гидрофобным свойствам поверхностно-активного вещества называют гидролипидным балансом (HLB), и он представляет собой ценный инструмент для классификации и выбора поверхностно-активных веществ при получении составов. Поверхностно-активные вещества можно разделить на различные классы, в зависимости от природы гидрофильной группы: неионная, анионная, катионная и амфотерная (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

Богатый набор неэмульгирующих материалов также включен в эмульсионные

составы и делает вклад в свойства эмульсий. Они включают жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, жирные эфиры, увлажняющие агенты, гидрофильные коллоиды, консерванты и антиоксиданты (Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

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

#### ii. Микроэмульсии

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

#### iii. Микрочастицы

иРНК по изобретению может быть включена в частицу, например, в микрочастицу. Микрочастицы могут быть получены распылительной сушкой, но также могут быть получены другими способами, включая лиофилизацию, выпаривание, сушку в псевдооживленном слое, вакуумную сушку или комбинацию этих методов.

#### iv. Усилители проникновения

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении используются различные усилители проникновения для эффективной доставки нуклеиновых кислот, в частности иРНК, в кожу животных. Большинство лекарственных средств присутствуют в растворе как в ионизированной, так и в неионизированной формах. Однако обычно только жирорастворимые или липофильные лекарственные средства легко проникают через

клеточные мембраны. Было обнаружено, что даже нелипофильные лекарственные средства могут проникать через клеточные мембраны, если мембрана, которую необходимо преодолеть, обработана усилителем проникновения. Помимо содействия диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны, усилители проникновения также повышают проницаемость липофильных препаратов. Усилители проникновения можно отнести к одной из пяти широких категорий, т.е. поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие агенты и нехелатирующие не поверхностно-активные вещества (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92). Каждый из вышеупомянутых классов усилителей проникновения и их применение в получении фармацевтических композиций и доставке фармацевтических агентов хорошо известны в данной области.

#### v. Эксципиенты

В отличие от соединения, являющегося носителем, «фармацевтический носитель» или «эксципиент» представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующий агент или любую другую фармацевтически инертную среду для доставки одной или более нуклеиновых кислот в животное. Эксципиент может быть жидким или твердым, и его выбирают с учетом планируемого способа введения, чтобы обеспечивать требуемый объем, плотность и т.д., при комбинировании с нуклеиновой кислотой и другими компонентами указанной фармацевтической композиции. Такие агенты хорошо известны в данной области.

#### vi. Другие компоненты

Композиции настоящего изобретения могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, общепринято обнаруживаемые в фармацевтических композициях, при их установленном в данной области уровне техники потребления. Таким образом, например, композиции могут содержать дополнительные, совместимые, фармацевтически активные материалы, такие как, например, противозудные средства, аstringенты, местные анестетики или противовоспалительные агенты, или могут содержать дополнительные материалы, пригодные для физического формулирования различных лекарственных форм композиций настоящего изобретения, такие как красители, ароматизаторы, консерванты, антиоксиданты, замутнители, загустители и стабилизаторы. Однако такие материалы при добавлении не должны чрезмерно препятствовать биологическим активностям компонентов композиций настоящего изобретения. Составы можно стерилизовать и, при желании, смешивать со вспомогательными агентами, например, скользкими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими агентами, эмульгаторами, солями, влияющими на осмотическое давление, буферами, красителями, ароматизаторами или ароматическими веществами и подобными, которые не взаимодействуют пагубно с нуклеиновой кислотой (нуклеиновыми кислотами) состава.

Водные суспензии могут содержать вещества, которые повышают вязкость

суспензии, включая, например, натрийкарбоксиметилцеллюлозу, сорбит или декстран. Суспензия может также содержать стабилизаторы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в изобретении, включают (а) одну или несколько иРНК и (б) одно или несколько средств, которые действуют по механизму, отличному от иРНК, и которые применимы для лечения расстройств, связанных с апополипротеином С3, например, гипертриглицеридемия.

Токсичность и профилактическую эффективность данных соединений можно определить стандартными фармацевтическими способами в клеточных культурах или на экспериментальных животных, например, для определения LD50 (дозы, летальной для 50% популяции) и ED50 (дозы, профилактически эффективной для 50% популяции). Соотношение дозы токсичного эффекта к терапевтическому эффекту представляет собой терапевтический индекс, и он может быть выражен как отношение LD50/ED50. Соединения, которые обладают высоким терапевтическим индексом, являются предпочтительными.

Данные, полученные в анализах на клеточных культурах и исследованиях на животных, можно использовать для формулирования диапазона доз для применения на людях. Доза композиций, представленных в настоящем изобретении, обычно лежит в диапазоне циркулирующих концентраций, которые включают ED50, предпочтительно ED80 или ED90, с малой токсичностью или без нее. Доза может изменяться в пределах данного диапазона, в зависимости от применяемой лекарственной формы и применяемого пути введения. Для любого соединения, применяемого в способах, представленных в настоящем изобретении, профилактически эффективные дозы можно первоначально оценить в анализах на клеточных культурах. Дозу можно формулировать на животных моделях, с получением диапазона циркулирующих в плазме концентраций соединения или, при необходимости, полипептидного продукта последовательности-мишени (например, достигая снижения концентрации полипептида), который включает IC50 (т.е. концентрацию тестируемого соединения, которая достигает полумаксимального ингибирования симптомов) или более высокие уровни ингибирования, как определено в клеточной культуре. Данную информацию можно использовать для более точного определения подходящих доз для человека. Концентрацию в плазме можно измерить, например, высокоэффективной жидкостной хроматографией.

В добавление к их введению, как обсуждалось выше, иРНК, представленные в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными агентами, используемыми для профилактики или лечения расстройств, связанных с апополипротеином С3, например, гипертриглицеридемии. В любом случае, врач, осуществляющий введение, может установить количество и временные интервалы введения иРНК на основе результатов, полученных с использованием стандартных показателей эффективности, известных в данной области или описанные в настоящем изобретении.

## VI. Способы ингибирования экспрессии аполипопротеина С3

Настоящее изобретение также относится к способам ингибирования экспрессии гена АРОС3 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с агентом РНК, например агентом двухцепочечной РНК, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии АРОС3 в клетке, тем самым ингибируя экспрессию АРОС3 в клетке.

Приведение в контакт клетки с иРНК, например агентом двухцепочечной РНК, может осуществляться *in vitro* или *in vivo*. Приведение клетки в контакт *in vivo* с иРНК включает приведение в контакт клетки или группы клеток субъекта, например человека, с иРНК. Также возможны комбинации способов приведения клетки в контакта с клеткой *in vitro* и *in vivo*. Контакт с клеткой может быть прямым или косвенным, как описано выше. Кроме того, контакт с клеткой может быть осуществлен с помощью нацеливающего лиганда, включая любой лиганд, описанный в настоящем документе или известный в данной области техники. В предпочтительных вариантах осуществления нацеливающий лиганд представляет собой углеводную часть, например, лиганд GalNAc<sub>3</sub> или любой другой лиганд, который направляет агент РНК-и в интересующий сайт.

Термин «ингибирование», используемый в настоящем документе, используется взаимозаменяемо с терминами «уменьшение», «снижение», «подавление», «ослабление» и другими подобными терминами и включает любой уровень ингибирования.

Фраза «ингибирование экспрессии аполипопротеина С3» предназначена для обозначения ингибирования экспрессии любого гена аполипопротеина С3 (например, гена аполипопротеина С3 мыши, гена аполипопротеина С3 крысы, гена аполипопротеина С3 обезьяны или гена аполипопротеина С3 человека), а также варианты или мутанты гена аполипопротеина С3. Таким образом, ген аполипопротеина С3 может быть геном аполипопротеина С3 дикого типа, мутантным геном аполипопротеина С3 или трансгенным геном аполипопротеина С3 в контексте генетически модифицированной клетки, группы клеток или организма.

«Ингибирование экспрессии гена аполипопротеина С3» включает любой уровень ингибирования гена аполипопротеина С3, например, по меньшей мере частичное подавление экспрессии гена аполипопротеина С3. Экспрессию гена аполипопротеина С3 можно оценивать на основании уровня или изменения уровня любой переменной, связанной с экспрессией гена аполипопротеина С3, например, уровня мРНК аполипопротеина С3 или уровня белка аполипопротеина С3. Этот уровень можно оценить в отдельной клетке или в группе клеток, включая, например, образец, полученный от субъекта. Понятно, что аполипопротеин С3 экспрессируется преимущественно в печени, а также в головном мозге, желчном пузыре, сердце и почках и присутствует в кровотоке.

Ингибирование можно оценить по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких переменных, связанных с экспрессией аполипопротеина С3, по сравнению с контрольным уровнем. Контрольный уровень может представлять собой контрольный уровень любого типа, который используется в данной области, например, исходный уровень перед введением дозы или уровень, определенный на аналогичном

субъекте, клетке или образце, которые не подвергали лечению или подвергали лечению контролем (таким как, например, контроль только буфером или контроль неактивным агентом).

В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению экспрессия гена аполипопротеина С3 ингибируется по меньшей мере на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, или 95%, или ниже уровня обнаружения анализа. В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия гена аполипопротеина С3 ингибируется по меньшей мере на 70%. Также понятно, что может быть желательным ингибирование экспрессии аполипопротеина С3 в определенных тканях, например, в печени, без значительного ингибирования экспрессии в других тканях, например, мозге. В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии определяют с использованием метода анализа, представленного в примере 2, с концентрацией миРНК 10 нМ в клеточной линии соответствующих видов.

В некоторых вариантах осуществления ингибирование экспрессии *in vivo* определяется нокдауном человеческого гена у грызунов, экспрессирующих человеческий ген, например, у AAV-инфицированной мыши, экспрессирующей человеческий ген-мишень (т.е. аполипопротеин С3), например, при введении в виде однократной дозы, например, 3 мг/кг при надире экспрессии РНК. Нокдаун экспрессии эндогенного гена в системе модели на животных также можно определить, например, после введения однократной дозы, например, 3 мг/кг при надире экспрессии РНК. Такие системы применимы, когда последовательность нуклеиновой кислоты гена человека и гена животной модели достаточно близки, так что иРНК человека обеспечивает эффективный нокдаун гена животной модели. Экспрессию РНК в печени определяют с использованием методов ПЦР, представленных в примере 2.

Ингибирование экспрессии гена аполипопротеина С3 может проявляться снижением количества мРНК, экспрессируемой первой клеткой или группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном от субъекта), в котором ген аполипопротеина С3 транскрибируется и которая обработана или которые обработаны (например, путем приведения в контакт клетки или клеток с иРНК по изобретению или путем введения иРНК по изобретению субъекту, у которого клетки присутствуют или присутствовали), так, что экспрессия гена аполипопротеина С3 ингибирована по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичных первой клетке или группе клеток, но которая не обработана или которые не обработаны (контрольные клетки, не обработанные иРНК или не обработанные иРНК, нацеленные на интересующий ген). В предпочтительных вариантах осуществления ингибирование оценивают способом, представленным в примере 2, с использованием концентрации миРНК 10 нМ в клеточной линии соответствующего вида и выражением уровня мРНК в обработанных клетках в процентах от уровня мРНК в контрольных клетках, используя следующую формулу:

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

В других вариантах осуществления ингибирование экспрессии гена аполипопротеина С3 можно оценить по снижению параметра, который функционально связан с экспрессией гена аполипопротеина С3, например уровня белка аполипопротеина С3 в крови или сыворотке субъекта. Сайленсинг гена аполипопротеина С3 можно определить в любой клетке, экспрессирующей аполипопротеин С3, как эндогенной, так и гетерологичной, из экспрессионной конструкции, и с помощью любого анализа, известного в данной области.

Ингибирование экспрессии белка аполипопротеина С3 может проявляться снижением уровня белка аполипопротеина С3, который экспрессируется клеткой или группой клеток или в образце субъекта (например, уровень белка в образце крови, полученном от субъекта). Как объяснялось выше, для оценки подавления мРНК ингибирование уровня экспрессии белка в обработанной клетке или группе клеток может быть аналогичным образом выражено в процентах от уровня белка в контрольной клетке или группе клеток, или изменением в уровне белка в образце от субъекта, например крови или полученной из нее сыворотке.

Контрольная клетка, группа клеток или образец субъекта, которые могут быть использованы для оценки ингибирования экспрессии гена аполипопротеина С3, включают клетку, группу клеток или образец субъекта, которые еще не контактировали с агентом РНКи по изобретению. Например, контрольная клетка, группа клеток или образец субъекта могут быть получены от конкретного субъекта (например, человека или животного) до лечения субъекта агентом РНКи или соответствующим образом подобранной контрольной популяции.

Уровень мРНК аполипопротеина С3, который экспрессируется клеткой или группой клеток, может быть определен с использованием любого известного в данной области способа оценки экспрессии мРНК. В одном варианте осуществления уровень экспрессии аполипопротеина С3 в образце определяют путем обнаружения транскрибируемого полинуклеотида или его части, например, мРНК гена аполипопротеина С3. РНК можно экстрагировать из клеток с использованием методов выделения РНК, включая, например, экстракцию кислотным фенолом/гуанидинизотиоцианатом (RNazol B; Biogenesis), наборы для получения РНК RNeasy™ (Qiagen®) или PAXgene™ (PreAnalytix™, Швейцария). Типичные форматы анализа, использующие гибридизацию рибонуклеиновой кислоты, включают ядерный кинетический анализ, ОТ-ПЦР, анализы защиты от РНКаз, нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ* и микроматричный анализ.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии аполипопротеина С3 определяют с помощью зонда на основе нуклеиновой кислоты. Термин «зонд», используемый в настоящем документе, относится к любой молекуле, которая способна избирательно связываться со специфическим аполипопротеином С3. Зонды могут быть

синтезированы специалистом в данной области или получены из соответствующих биологических препаратов. Зонды могут быть специально разработаны для маркировки. Примеры молекул, которые можно использовать в качестве зондов, включают, но не ограничиваются ими, РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

Выделенную мРНК можно использовать в анализах гибридизации или амплификации, которые включают, но не ограничиваются ими, Саузерн- или Нозерн-анализ, анализ полимеразной цепной реакции (ПЦР) и наборы зондов. Один из способов определения уровней мРНК включает контактирование выделенной мРНК с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с мРНК аполипопротеина С3. В одном варианте осуществления мРНК иммобилизуют на твердой поверхности и приводят в контакт с зондом, например, помещая выделенную мРНК на агарозный гель и перенося мРНК из геля на мембрану, такую как нитроцеллюлоза. В альтернативном варианте осуществления зонд(зонды) иммобилизуют на твердой поверхности, и мРНК контактирует с зондом(зондами), например, в матрице генных чипов Affymetrix®. Квалифицированный специалист может легко адаптировать известные способы обнаружения мРНК для использования при определении уровня мРНК аполипопротеина С3.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии аполипопротеина С3 в образце включает процесс амплификации нуклеиновой кислоты или обратной транскриптазы (для получения кДНК), например, мРНК в образце, например, с помощью ОТ-ПЦР (экспериментальный вариант осуществления представлен в Mullis, 1987, U.S. Patent No. 4,683,202), лигазной цепной реакции (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), самоподдерживающейся репликации последовательностей (Guatelli *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), системы транскрипционной амплификации (Kwoh *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-бета-репликазы (Lizardi *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:1197), репликации по типу "катящегося кольца" (Lizardi *et al.*, патент США No. 5854033) или любой другой амплификации нуклеиновой кислоты, с последующим обнаружением амплифицированных молекул с использованием методов, хорошо известных специалистам в данной области. Эти схемы обнаружения особенно полезны для обнаружения молекул нуклеиновых кислот, если такие молекулы присутствуют в очень небольшом количестве. В конкретных аспектах изобретения уровень экспрессии АРОС3 определяют с помощью количественной флуорогенной ОТ-ПЦР (т.е. системы TaqMan™). В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии определяют с помощью способа, представленного в примере 2, с использованием, например, концентрации мимРНК 10 нМ в клеточной линии соответствующего вида.

Уровни экспрессии мРНК аполипопротеина С3 можно отслеживать с помощью мембранного блоттинга (например, используемого в гибридизационном анализе, такого как нозерн, саузерн, дот и т.п.) или микролунок, пробирок для образцов, гелей, шариков или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанные нуклеиновые кислоты). См. патент США No. 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены в

настоящий документ в качестве ссылки. Определение уровня экспрессии аполипопротеина С3 может также включать использование зондов нуклеиновых кислот в растворе.

В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии мРНК оценивают с помощью анализов разветвленной ДНК (bDNA) или ПЦР в реальном времени (qPCR). Использование этих способов описано и проиллюстрировано в примерах, представленных в настоящем документе. В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии определяют методом, представленным в примере 2, с использованием концентрации миРНК 10 нМ в клеточной линии соответствующего вида.

Уровень экспрессии белка АРОС3 можно определить с использованием любого известного в данной области метода измерения уровней белка. Такие способы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), тонкослойную хроматографию (ТСХ), гипердиффузионную хроматографию, реакции преципитации в жидкости или геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию. (одинарный или двойной), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммунофлуоресцентный анализ, электрохемилюминесцентный анализ и т.п.

В некоторых вариантах осуществления эффективность способов по изобретению оценивают по снижению уровня мРНК С3 или белка (например, в биопсии печени).

В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению иРНК вводят субъекту таким образом, что иРНК доставляется в определенный участок внутри субъекта. Ингибирование экспрессии аполипопротеина С3 можно оценить с помощью измерения уровня или изменения уровня мРНК аполипопротеина С3 или белка аполипопротеина С3 в образце, полученном из жидкости или ткани из определенного участка организма субъекта (например, печени или крови).

Используемые в настоящем документе термины «обнаружение или определение уровня анализируемого вещества» означают выполнение стадий для определения наличия материала, например, белка, РНК. Используемые в настоящем документе методы обнаружения или определения включают обнаружение или определение уровня аналита, который ниже уровня обнаружения для используемого способа.

## VII. Способы профилактики и лечения по изобретению

Настоящее изобретение также относится к способам применения иРНК по изобретению или композиции, содержащей иРНК по изобретению, для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3, для предотвращения или лечения расстройства, ассоциированного с аполипопротеином С3, например, гипертриглицеридемия, неалкогольная жировая болезнь печени, неалкогольный стеатогепатит, синдром поликистозных яичников, заболевание почек, ожирение, сахарный диабет 2 типа (инсулинорезистентность); гипертензия; сердечно-сосудистые заболевания, например, атеросклероз; и панкреатит, например, острый панкреатит. В способах по изобретению

клетку можно приводить в контакт с миРНК *in vitro* или *in vivo*, т.е. клетка может находиться внутри субъекта.

Клетка, подходящая для лечения с использованием способов по изобретению, может быть любой клеткой, которая экспрессирует ген аполипопротеина С3, например, клеткой печени, клеткой головного мозга, клеткой желчного пузыря, клеткой сердца или клеткой почки, но предпочтительно клеткой печени. Клеткой, подходящей для использования в способах по изобретению, может быть клетка млекопитающего, например, клетка примата (такая как человеческая клетка, включая человеческую клетку химерного животного, отличного от человека, или клетка примата, отличного от человека, например, клетка обезьяны или клетка шимпанзе), или неприматная клетка. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, например, клетку печени человека. В способах по изобретению экспрессия аполипопротеина С3 ингибируется в клетке по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 или до уровня ниже уровня обнаружения анализ.

Способы *in vivo* по изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей иРНК, где иРНК включает нуклеотидную последовательность, которая комплементарна по меньшей мере части РНК-транскрипта гена аполипопротеина С3 млекопитающего, которому агент РНКи должен быть введен. Композицию можно вводить любыми способами, известными в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, пероральный, внутрибрюшинный или парентеральный пути, включая внутрочерепное (например, внутрижелудочковое, интрапаренхиматозное и интратекальное), внутривенное, внутримышечное, подкожное, чрескожное, дыхательное (аэрозольный), назальное, ректальное и местное (включая трансбуккальное и подъязычное) введение. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят путем подкожной инъекции. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят внутримышечной инъекции.

В одном аспекте настоящее изобретение также обеспечивает способы ингибирования экспрессии гена аполипопротеина С3 у млекопитающего. Способы включают введение млекопитающему композиции, содержащей дцРНК, которая нацелена на ген аполипопротеина С3 в клетке млекопитающего, и поддержание млекопитающего в течение времени, достаточного для деградации транскрипта мРНК гена аполипопротеина С3, тем самым ингибируя экспрессию гена аполипопротеина С3 в клетке. Снижение экспрессии гена можно оценить любыми способами, известными в данной области, и способами, например, qRT-PCR, описанной в настоящем документе, например, в примере 2. Снижение продукции белка можно оценить любыми способами, известными в данной области, например, ELISA. В некоторых вариантах осуществления образец пункционной биопсии печени служит тканевым материалом для мониторинга снижения экспрессии гена аполипопротеина С3 или белка. В других вариантах осуществления образец крови служит образцом субъекта для мониторинга снижения экспрессии белка аполипопротеина С3.

Настоящее изобретение также обеспечивает способы лечения субъекта,

нуждающегося в этом, например, субъекта, у которого диагностировано расстройство, связанное с апополипротеином С3, такое как, гипертриглицеридемия, неалкогольная жировая болезнь печени, неалкогольный стеатогепатит, синдром поликистозных яичников, заболевание почек, ожирение, сахарный диабет 2 типа (инсулинорезистентность); гипертензия; сердечно-сосудистые заболевания, например, атеросклероз; и панкреатит, например, острый панкреатит.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает способы профилактики у субъекта, нуждающегося в этом. Способы лечения по изобретению включают введение иРНК по изобретению субъекту, например, субъекту, у которого было бы полезно снижение экспрессии апополипротеина С3, в профилактически эффективном количестве иРНК, нацеленной на ген апополипротеина С3, или фармацевтической композиции, содержащей иРНК, нацеленной на ген апополипротеина С3.

В одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с апополипротеином С3, выбрано из группы, состоящей из гипертриглицеридемии, неалкогольной жировой болезни печени, неалкогольного стеатогепатита, синдрома поликистозных яичников, заболевания почек, ожирения, сахарного диабета 2 типа (инсулинорезистентность); гипертензии; сердечно-сосудистых заболеваний, например, атеросклероза; и панкреатита, например, острого панкреатита.

В одном варианте осуществления АРОС3-ассоциированное заболевание представляет собой гипертриглицеридемию или высокий уровень триглицеридов. Уровни триглицеридов в сыворотке субъекта, например, субъекта-человека, которые могут быть свойственны гипертриглицеридемии, описаны в Oh, R. C. *et al.*, (2007) *American Family Physician*, 75(9):1366-1371. Specifically, гипертриглицеридемия может быть связана с “погранично-высоким уровнем триглицеридов в сыворотке” (т.е. 150-199 мг на дл или 1,70-2,25 ммоль на л); “высоким уровнем триглицеридов в сыворотке” (т.е. 200-499 мг на дл или 2,26-5,64 ммоль на л); или “очень высоким уровнем триглицеридов” (т.е. 500 мг на дл или выше (или 5,65 ммоль на л или выше)

В одном варианте осуществления АРОС3-ассоциированное заболевание представляет собой первичную гипертриглицеридемию. “Первичная триглицеридемия” возникает вследствие экологических или генетических причин (например, в результате отсутствия очевидной основной медицинской причины). Типичные заболевания, характеризующиеся как первичные гипертриглицеридемии, включают, но не ограничиваются ими, семейную хиломикронемию (гиперлипопротеинемия типа I), первичную смешанную гиперлипидемию (тип 5), семейную гипертриглицеридемию (гиперлипопротеинемия типа 4), семейную комбинированную гиперлипопротеинемию (тип 2B) и семейную дисбеталипопротеинемию (гиперлипопротеинемия типа 3).

В другом варианте осуществления АРОС3-ассоциированное заболевание представляет собой вторичную гипертриглицеридемию. “Вторичная триглицеридемия” вызвана или связана с другими основными расстройствами и состояниями. Такие расстройства и/или состояния включают, например, ожирение, метаболический синдром,

диабет, жировую дегенерацию печени, употребление алкоголя, заболевание почек, беременность, неалкогольную жировую болезнь печени, гипотиреоз, парапротеинемии (такие как гипергаммаглобулинемия при макроглобулинемии, миелома, лимфома и лимфолейкозы), аутоиммунные заболевания (такие как системная красная волчанка), прием лекарственных препаратов (таких как антиретровирусные препараты, включая ритонавир и лопинавир, и антипсихотические препараты, включая клозапин и оланзапин), см. G. Yuan *et al.*, (2007) *Canadian Medical Association Journal*, 176(8):1113-1120.

Любое расстройство, которое может быть причиной гипертриглицеридемии (например, вторичной гипертриглицеридемии) или которое может быть следствием гипертриглицеридемии (например, первичной или вторичной гипертриглицеридемии), охватывается термином «АРОС3-ассоциированное заболевание». Неограничивающие примеры АРОС3-ассоциированных заболеваний включают метаболические нарушения, например, неалкогольная жировая болезнь печени, неалкогольный стеатогепатит, синдром поликистозных яичников, заболевание почек, ожирение, сахарный диабет 2 типа (инсулинорезистентность); гипертензия; сердечно-сосудистые заболевания, например, атеросклероз; и панкреатит, например, острый панкреатит.

иРНК по изобретению можно вводить в виде «свободной иРНК». Свободную иРНК вводят в отсутствие фармацевтической композиции. “Голая” иРНК может находиться в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может содержать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В одном варианте осуществления буферный раствор представляет собой забуференный фосфатом солевой раствор (PBS). pH и осмолярность буферного раствора, содержащего иРНК, можно отрегулировать таким образом, чтобы он подходил для введения субъекту.

В качестве альтернативы иРНК по изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, такой как липосомальная композиция дцРНК.

Субъекты, которым может быть полезно ингибирование экспрессии гена АРОС3, являются субъектами, предрасположенными к или у которых диагностировано расстройство, ассоциированное с АРОС3, такое как гипертриглицеридемия, неалкогольная жировая болезнь печени, неалкогольного стеатогепатита, синдром поликистозных яичников, заболевание почек, ожирение, сахарный диабет 2 типа (инсулинорезистентность); гипертензия; сердечно-сосудистые заболевания, например, атеросклероз; и панкреатит, например, острый панкреатит.

В одном варианте осуществления способ включает введение композиции, описанной в настоящем документе, таким образом, что экспрессия целевого гена аполипопротеина С3 снижается, например, в течение примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 1-6, 1-3 или 3-6 месяцев на одну дозу. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят один раз в 3-6 месяцев.

Предпочтительно иРНК, пригодные для способов и композиций, описанных в настоящем документе, нацелены конкретно на РНК (первичные или процессированные) гена-мишени аполипопротеина С3. Композиции и способы ингибирования экспрессии этих генов с использованием иРНК можно получить и осуществить, как описано в настоящем

документе.

Введение иРНК в соответствии со способами по изобретению может привести к профилактике или лечению расстройств, ассоциированных с апополипротеином С3, например, гипертриглицеридемии, неалкогольной жировой болезни печени, неалкогольного стеатогепатита, синдрома поликистозных яичников, заболевания почек, ожирения, сахарного диабета 2 типа (инсулинорезистентность); гипертензии; сердечно-сосудистых заболеваний, например, атеросклероза; и панкреатита, например, острого панкреатита.

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

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

Введение можно повторять на регулярной основе. В некоторых вариантах осуществления после начальной схемы лечения лечение можно проводить реже. Режим повторных доз может включать введение терапевтического количества иРНК на регулярной основе, например, от одного раза в месяц до одного раза в год. В некоторых вариантах осуществления иРНК вводят примерно от одного раза в месяц до примерно одного раза в три месяца или примерно от одного раза в три месяца до примерно одного раза в шесть месяцев.

Изобретение дополнительно обеспечивает способы и применения агента иРНК или его фармацевтической композиции для лечения субъекта, который получит положительный эффект от снижения и/или ингибирования экспрессии гена АРОС3, например, субъекта, имеющего заболевание, ассоциированное с АРОС3, в комбинации с другими фармацевтическими препаратами и/или другими терапевтическими методами, например, с использованием известных фармацевтических препаратов и/или известных терапевтических методов, таких как, например, те, которые в настоящее время используются для лечения этих заболеваний.

Соответственно, в некоторых аспектах изобретения способы, которые включают такое одно средство иРНК по изобретению, дополнительно включают введение субъекту одного или нескольких дополнительных терапевтических средств.

Агент иРНК и дополнительное терапевтическое средство и/или лечение можно вводить одновременно и/или в одной и той же комбинации, например, парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельной композиции или в разное время и/или другим способом, известным в данной области или описанным в настоящем документе.

Примеры дополнительных терапевтических средств включают средства, известные для лечения гипертриглицеридемии и других заболеваний, которые вызваны гипертриглицеридемией, связаны с ней или являются ее следствием. Например, иРНК, представленная в изобретении, может быть введена, например, с ингибитором PCSK9

(например, моноклональным антителом против PCSK9, например, эволокумаб (Repatha®) и алирокумаб (Praluent®), агентом дцРНК, нацеленным на PCSK9 (например, инклизран)), ингибитором HMG-CoA-редуктазы (например, статины), фибратом, секвестрантом желчных кислот, ниацином, антитромбоцитарным средством, ингибитором ангиотензинпревращающего фермента, антагонистом рецепторов ангиотензина II (например, лозартан калия, такой как Merck & Co. 's Cozaar®), ингибитором ацил-CoA-холестерин-ацетилтрансферазы (ACAT), ингибитором абсорбции холестерина, ингибитором белка переноса холестерилового эфира (CETP), ингибитором микросомального белка-переносчика триглицеридов (MTPP), модулятором холестерина, модулятором желчных кислот, агонистом рецептора активаторов пролиферации пероксисом (PPAR), генной терапией, составным средством для защиты сосудов (например, AGI-1067, от Atherogenics), ингибитором гликопротеина IIb/IIIa, аспирином или аспириноподобным соединением, ингибитором IBAT (например, S-8921, от Shionogi), ингибитором скваленсинтазы, ингибитором моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP)-I или рыбьим жиром. Примеры ингибиторов HMG-CoA-редуктазы включают аторвастатин (Pfizer's Lipitor®/Tahor/Sortis/Torvast/Cardyl), правастатин (Bristol-Myers Squibb 's Pravachol, Sankyo's Mevalotin/Sanapprav), симвастатин (Merck's Zocor®/Sinvacor, Boehringer Ingelheim's Denan, Banyu's Lipovas), ловастатин (Merck's Mevacor/Mevinacor, Bexal's Lovastatina, Cepa; Schwarz Pharma's Liposcler), флувастатин (Novartis' Lescol®/Locol/Lochol, Fujisawa's Cranoc, Solvay's Digaril), церивастатин (Bayer's Lipobay/GlaxoSmithKline's Baycol), розувастатин (AstraZeneca's Crestor®), и питивастатин (итавастатин/рисивастатин) (Nissan Chemical, Kowa Kogyo, Sankyo, и Novartis). Примеры фибратов включают, например, безафибрат (например, Roche's Befizal®/Cedur®/Bezalip®, Kissei's Bezatol), клофибрат (например, Wyeth's Atromid-S®), фенофибрат (например, Fournier's Lipidil/Lipantil, Abbott's Tricor®, Takeda's Lipantil, generics), гемфиброзил (например, Pfizer's Lopid/Lipur) и ципрофибрат (Sanofi-Synthelabo's Modalim®). Примеры секвестрантов желчных кислот включают, например, холестирамин (Bristol-Myers Squibb's Questran® и Questran Light™), колестипол (например, Pharmacia's Colestid) и колесевелам (Genzyme/Sankyo's WelChol™). Примеры ниациновой терапии включают, например, составы с немедленным высвобождением, такие как Nicobid от Aventis, Niacor от Upsher-Smith, Nicolar от Aventis и Perycit от Sanwakagaku. Композиции с пролонгированным высвобождением ниацина включают, например, Kos Pharmaceuticals' Niaspan и Upsher-Smith's SIO- Niacin. Примеры антитромбоцитарных средств включают, например, аспирин (например, аспирин от Bayer), клопидогрел (Sanofi-Synthelabo/Bristol-Myers Squibb's Plavix) и тиклопидин (например, Тиклид от Sanofi-Synthelabo и Panaldine от Daiichi). Другие подобные аспирину соединения, применимые в комбинации с дцРНК, нацеленной на АРОС3, включают, например, Asacard (аспирин с медленным высвобождением, Pharmacia) и памикогрел (Kanebo/Angelini Ricerche/CEPA). Примеры ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента включают, например, рамиприл (например, Aventis' Altace) и эналаприл (например, Merck & Co.'s Vasotec). Примеры ингибиторов ацил-CoA-

холестерин-ацетилтрансферазы (ACAT) включают, например, авасимиб (Pfizer), эфлуцимиб (BioMerieux Pierre Fabre/Eli Lilly), CS-505 (Sankyo and Kyoto), и SMP-797 (Sumito). Примеры ингибиторов абсорбции холестерина включают, например, эзетимиб (Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals Zetia®) и памакезид (Pfizer). Примеры ингибиторов CETP включают, например, торцетрапиб (также называемый CP-529414, Pfizer), JTT-705 (Japan Tobacco) и CETi-I (Avant Immunotherapeutics). Примеры ингибиторов микросомального белка-переносчика триглицеридов включают, например, имплитапид (Bayer), R-103757 (Janssen) и CP-346086 (Pfizer). Другие примеры модуляторов холестерина включают, *например*, NO- 1886 (Otsuka/TAP Pharmaceutical), CI- 1027 (Pfizer), и WAY-135433 (Wyeth-Ayerst).

Примеры модуляторов желчных кислот включают, например, HBS-107 (Hisamitsu/Banyu), Btg-511 (British Technology Group), BARI-1453 (Aventis), S-8921 (Shionogi), SD-5613 (Pfizer) и AZD- 7806 (AstraZeneca). Примеры агонистов рецептора активаторов пролиферации пероксисом (PPAR) включают, например, тесаглитазар (AZ-242) (AstraZeneca), нетоглитазон (MCC-555) (Mitsubishi/ Johnson & Johnson), GW-409544 (Ligand Pharmaceuticals/GlaxoSmithKline), GW-501516 (Ligand Pharmaceuticals/GlaxoSmithKline), LY-929 (Ligand Pharmaceuticals and Eli Lilly), LY-465608 (Ligand Pharmaceuticals and Eli Lilly), LY-518674 (Ligand Pharmaceuticals and Eli Lilly), и МК-767 (Merck and Kyorin). Примеры генной терапии включают, например, AdGWEGF 121.10 (GenVec), ApoA1 (UCB Pharma/Groupe Fournier), EG-004 (Trinam) (Ark Therapeutics) и АТФ-связывающий кассетный транспортер-А1 (ABCA1) (CV Therapeutics/Incyte, Aventis, Xenon). Примеры ингибиторов гликопротеина IIb/IIIa включают, например, роксифибан (также называемый DMP754, Bristol-Myers Squibb), гантофибан (Merck KGaA/Yamanouchi), и кромафибан (Millennium Pharmaceuticals). Примеры ингибиторов скваленсинтазы включают, например, BMS-1884941 (Bristol-Myers Squibb), CP-210172 (Pfizer), CP-295697 (Pfizer), CP-294838 (Pfizer), и ТАК-475 (Takeda). Типичным ингибитором МСР-I является, например, RS-504393 (Roche Bioscience). Антиатеросклеротическое средство ВО- 653 (Chugai Pharmaceuticals), и производное никотиновой кислоты Nyclin (Yamanouchi Pharmaceuticals) также подходят для введения в комбинации с дцРНК, представленной в изобретении. Типичные комбинированные терапии, подходящие для введения с дцРНК, нацеленной на АРОС3, включают, например, адвикор (ниацин/ловастатин от Kos Pharmaceuticals), амлодипин/аторвастатин (Pfizer), и эзетимиб/симвастатин (например, Vytorin® 10/10, 10/20, 10/40 и 10/80 таблетки от Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals). Агенты для лечения гипертриглицеридемии и подходящие для введения в сочетании с дцРНК, нацеленной на АРОС3, включают, например, ловастатин, ниацин Altoprev® таблетки с замедленным высвобождением (Andrx Labs), таблетки ловастатин Caduet® (Pfizer), амлодипина безилат, аторвастатин кальций в таблетках Crestor® (AstraZeneca), розувастатин кальций Lescol® Capsules (Novartis), флувастатин натрия Lescol® (Reliant, Novartis), флувастатин натрия Lipitor® таблетки (Parke-Davis), аторвастатин кальция капсулы Lofibra® (Gate), таблетки с замедленным высвобождением Niaspan (Kos), ниацин

таблетки правахол (Bristol-Myers Squibb), таблетки правастатина натрия TriCor® (Abbott), таблетки фенофибрат Vytorin® 10/10 (Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals), эзетимиб, симвастатин WelChol™ Tablets (Sankyo), колесевелама гидрохлорид Zetia® таблетки (Schering), эзетимиб Zetia® таблетки (Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals), и эзетимиб Zocor® таблетки (Merck).

В одном варианте осуществления агент иРНК вводят в сочетании с ингибитором PCSK9. В одном варианте осуществления ингибитор PCSK9 представляет собой моноклональное антитело против PCSK9, например эволокумаб (Repatha®) и алирокумаб (Praluent®). В другом варианте осуществления ингибитор PCSK9 представляет собой агент дцРНК, нацеленный на PCSK9, например, инклизирин. В одном варианте осуществления агент иРНК вводят пациенту, и затем пациенту вводят дополнительное терапевтическое средство (или наоборот). В другом варианте осуществления агент иРНК и дополнительное терапевтическое средство вводят одновременно.

В одном варианте осуществления агент иРНК вводят в сочетании с комбинацией эзетимиб/симвастатин (например, Vytorin® (Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals)). В одном варианте осуществления агент иРНК вводят пациенту, а затем пациенту вводят дополнительное терапевтическое средство (или наоборот). В другом варианте осуществления агент иРНК и дополнительное терапевтическое средство вводят одновременно.

Агент иРНК и дополнительное терапевтическое средство и/или лечение можно вводить одновременно и/или в одной и той же комбинации, например, парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельной композиции или в разное время и /или другим способом, известным в данной области или описанным в настоящем документе.

### VIII. Наборы

В некоторых аспектах настоящее изобретение предоставляет наборы, которые включают подходящий контейнер, содержащий лекарственную форму соединения миРНК, например, соединения двухцепочечного миРНК или соединения ssiRNA (например, предшественника, например, соединения более крупной миРНК, которое может подвергаться процессингу в соединение ssiRNA или ДНК, которая кодирует соединение миРНК, например, соединение двухцепочечной миРНК или соединение ssiRNA, или их предшественник).

Такие наборы включают один или несколько агентов дцРНК и инструкции по применению, например, инструкции по введению профилактически или терапевтически эффективного количества агента(агентов) дцРНК. Агент дцРНК может находиться во флаконе или в предварительно наполненном шприце. Наборы могут необязательно дополнительно содержать средства для введения агента дцРНК (например, устройство для инъекций, такое как предварительно наполненный шприц) или средства для измерения ингибирования АРОС3 (например, средства для измерения ингибирования мРНК АРОС3, белка АРОС3 и/или активности АРОС3). Такие средства для измерения ингибирования

АРОС3 могут включать средства для получения образца от субъекта, такого как, например, образец плазмы. Наборы по изобретению могут необязательно дополнительно включать средства для определения терапевтически эффективного или профилактически эффективного количества.

В некоторых вариантах осуществления отдельные компоненты лекарственной формы могут быть предоставлены в одном контейнере, например, во флаконе или предварительно заполненном шприце. В качестве альтернативы может быть желательным предоставить компоненты лекарственной формы по отдельности в двух или более контейнерах, например, один контейнер для препарата соединения миРНК и, по меньшей мере, другой контейнер для соединения-носителя. Набор может быть упакован в различных конфигурациях, например, один или несколько контейнеров в одной коробке. Различные компоненты можно комбинировать, например, в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к набору. Компоненты можно комбинировать в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, например, для приготовления и введения фармацевтической композиции. В комплект также может входить устройство доставки.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие. Полное содержание всех ссылок, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых в настоящей заявке, а также неофициальный перечень последовательностей и чертежи включены в настоящий документ посредством ссылки.

#### Примеры

##### Пример 1. Синтез иРНК

##### Источник реагентов

Когда источник реагента конкретно не указан в настоящем документе, такой реагент можно получить у любого поставщика реагентов для молекулярной биологии в соответствии со стандартом качества/чистоты для применения в молекулярной биологии.

##### Конструкция миРНК

миРНК, нацеленные на ген аполипопротеина С3 человека (АРОС3) (human: NCBI refseqID NM\_000040.3; NCBI GeneID: 345) были разработаны с использованием пользовательских сценариев R и Python. мРНК человека NM\_000040.3 REFSEQ имеет длину 535 оснований.

Подробные списки немодифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи АРОС3 показаны в таблицах 2 и 4. Подробные списки модифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи аполипопротеина С3 показаны в таблицах 3 и 5.

Следует понимать, что во всей заявке название дуплекса без десятичного знака эквивалентно названию дуплекса с десятичным знаком, которое просто ссылается на номер партии дуплекса. Например, AD-959917 эквивалентен AD-959917.1.

##### Синтез миРНК

миРНК синтезировали и подвергали гибридизации с использованием обычных

способов, известных в данной области.

Вкратце, последовательности миРНК синтезировали в масштабе 1 мкмоль с использованием синтезатора Mermade 192 (BioAutomation) с фосфорамидитной химией на твердых носителях. Твердая подложка представляла собой стекло с контролируемым размером пор (500-1000 Å), загруженное специальным лигандом GalNAc (конъюгаты 3'-GalNAc), универсальной твердой подложкой (AM Chemicals) или первым представляющим интерес нуклеотидом. Вспомогательные реагенты для синтеза и стандартные мономеры 2-цианоэтилфосфорамидита (2'-дезоксид-2'-фтор, 2'-О-метил, РНК, ДНК) получали от Thermo-Fisher (Milwaukee, WI), HONGENE (China), или Chemgenes (Wilmington, MA, USA). Дополнительные фосфорамидитные мономеры приобретали у коммерческих поставщиков, получали собственными силами или закупали с использованием индивидуального синтеза у различных СМО. Фосфорамидиты получали в концентрации 100 мМ либо в ацетонитриле, либо в смеси ацетонитрил:DMF 9:1, и связывали с использованием 5-этилтио-1Н-тетразола (ЕТТ, 0,25 М в ацетонитриле) со временем реакции 400 с. Фосфоротиоатные связи создавали с использованием 100 мМ раствора 3-((диметиламинометилен)амино)-3Н-1,2,4-дитиазол-3-тиона (DDTT, полученного от Chemgenes (Wilmington, MA, USA)) в безводном ацетонитриле/пиридине (9:1 об./об.). Время окисления составляло 5 минут. Все последовательности синтезировали с окончательным удалением группы DMT ("DMT-Off").

По завершении твердофазного синтеза олигорибонуклеотиды на твердой подложке обрабатывали 300 мкл метиламина (40% водный раствор) при комнатной температуре в 96-луночных планшетах в течение примерно 2 часов, для обеспечения отщепления от твердой подложки и последующее удаление всех дополнительных основание-лабильных защитных групп. Для последовательностей, содержащих любые природные рибонуклеотидные связи (2'-ОН), защищенные трет-бутилдиметилсилильной группой (TBDMS), вторую стадию снятия защиты проводили с использованием TEA.3HF (триэтиламин тригидрофторид). К каждому раствору олигонуклеотида в водном метиламине добавляли 200 мкл диметилсульфоксида (DMSO) и 300 мкл TEA.3HF, и раствор инкубировали в течение приблизительно 30 минут при 60°C. После инкубации планшету давали нагреться до комнатной температуры и неочищенные олигонуклеотиды осаждали добавлением 1 мл смеси 9:1 ацетонитрила:этанола или 1:1 этанола:изопропанола. Затем планшеты центрифугировали при 4°C в течение 45 мин и супернатант осторожно декантировали с помощью многоканальной пипетки. Осадок олигонуклеотида ресуспендировали в 20 мМ NaOAc и затем обессоливали с использованием эксклюзионной колонки HiTrap (5 мл, GE Healthcare) на системе Agilent LC, оснащенной автоматическим пробоотборником, УФ-детектором, кондуктометром и коллектором фракций. Обессоленные образцы собирали в 96-луночные планшеты, а затем анализировали с помощью ЖХ-МС и УФ-спектрометрии для подтверждения идентичности и количественного определения количества вещества, соответственно.

Дуплексирование одиночных нитей выполняли на роботе для работы с жидкостями Tecan. Смысловые и антисмысловые одиночные цепи объединяли в эквимольном

соотношении до конечной концентрации 10 мкМ в 1x PBS в 96-луночных планшетах, планшет герметизировали, инкубировали при 100°C в течение 10 минут, и затем медленно возвращали до комнатной температуры в течение периода 2-3 часа. Концентрацию и идентичность каждого дуплекса подтверждали и затем использовали для скрининговых анализов *in vitro*.

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

##### Культура клеток и трансфекции на 384-луночном планшете

Клетки Hep3b (ATCC, Manassas, VA) выращивали почти до конfluenceности при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в минимальной эссенциальной среде Игла (Gibco) с добавлением 10% FBS (ATCC) перед высвобождением из планшета трипсинизацией. Трансфекцию осуществляли добавлением 14,8 мкл Opti-MEM плюс 0,2 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Carlsbad CA. cat # 13778-150) к 5 мкл каждого дуплекса miRNA на отдельную лунку 96-луночного планшета. Затем смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем к смеси miRNA добавляли 80 мкл полной ростовой среды без антибиотика, содержащей ~2×10<sup>4</sup> клеток Hep3b. Клетки инкубировали в течение 24 часов перед очисткой РНК. Эксперименты с однократной дозой проводили при конечной концентрации дуплекса 10 нМ и 0,1 нМ, а эксперименты доза-эффект проводили с использованием 8х 5-кратных серийных разведений в диапазоне от 10 нМ до 128 пМ.

Выделение суммарной РНК с использованием набора для выделения мРНК DYNABEADS (Invitrogen™, part #: 610-12)

Клетки лизировали в 75 мкл буфера для лизиса/связывания, содержащего 3 мкл гранул на лунку, и перемешивали в течение 10 минут на электростатическом шейкере. Стадии промывки были автоматизированы на Biotek EL406 с использованием магнитной опоры для пластин. Гранулы промывали (в 90 мкл) один раз в буфере А, один раз в буфере В и дважды в буфере Е с промежуточными стадиями аспирации. После последней аспирации в каждую лунку добавляли полную смесь 10 мкл RT смеси, как описано ниже.

Синтез кДНК с использованием набора для обратной транскрипции кДНК высокой емкости ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat #4368813)

В каждую лунку добавляли мастер-смесь из 1 мкл 10X буфера, 0,4 мкл 25X dNTP, 1 мкл произвольных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 6,6 мкл H<sub>2</sub>O на реакцию. Планшеты герметично закрывали, встряхивали в течение 10 минут на электростатическом шейкере, а затем инкубировали при 37°C в течение 2 часов. После этого планшеты встряхивали при 80°C в течение 8 минут.

##### ПЦР в реальном времени

Два микролитра (мкл) кДНК добавляли к мастер-смеси, содержащей 0,5 мкл человеческого зонда GAPDH TaqMan (4326317E), 0,5 мкл человеческого АРОС3, 2 мкл воды, не содержащей нуклеаз, и 5 мкл мастер-смеси зонда Lightcycler 480 (Roche Cat # 04887301001) на лунку в 384-луночных планшетах (Roche cat # 04887301001). ПЦР в реальном времени проводили в системе LightCycler480 для ПЦР в реальном времени (Roche).

Для расчета относительного кратного изменения данные анализировали с использованием метода  $\Delta\Delta Ct$  и нормализовали относительно анализов, проводимых с клетками, трансфицированными 10 нМ AD-1955, или имитирующими трансфекцию клетками.  $IC_{50}$  рассчитывали с использованием модели для аппроксимации с 4 параметрами с использованием XLFit и нормализовали относительно клеток, трансфицированных AD-1955 или псевдо-трансфицированных.

Смысловая и антисмысловая последовательности AD-1955 представляют собой: смысловую: `cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT` (SEQ ID NO:22) и антисмысловую `UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT` (SEQ ID NO:23).

Результаты скрининга агентов дцРНК, перечисленных в таблицах 3 и 5, в клетках Нер3В представлены в таблицах 6 и 7, соответственно.

Таблица 1. Аббревиатуры нуклеотидных мономеров, используемые в представлении последовательностей нуклеиновых кислот. Понятно, что эти мономеры, когда они присутствуют в олигонуклеотиде, взаимно связаны 5'-3'-фосфодиэфирными связями.

Аббревиатура	Нуклеотид(нуклеотиды)
A	Аденозин-3'-фосфат
Ab	бета-L-аденозин-3`-фосфат
Abs	бета-L-аденозин-3`-фосфоротиоат
Af	2`-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2`-фтораденозин-3`-фосфоротиоат
As	аденозин-3`-фосфоротиоат
C	цитидин-3'-фосфат
Cb	бета-L-цитидин-3`-фосфат
Cbs	бета-L-цитидин-3'-фосфоротиоат
Cf	2`-фторцитидин-3`-фосфат
Cfs	2`-фторцитидин-3`-фосфоротиоат
Cs	цитидин-3`-фосфоротиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gb	бета-L-гуанозин-3`-фосфат
Gbs	бета-L-гуанозин-3`-фосфоротиоат
Gf	2`-фторгуанозин-3`-фосфат
Gfs	2`-фторгуанозин-3`-фосфоротиоат
Gs	гуанозин-3`-фосфоротиоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tf	2`-фтор-5-метилуридин-3`-фосфат
Tfs	2`-фтор-5-метилуридин-3`-фосфоротиоат

Ts	5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
U	Уридин-3'-фосфат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин-3'-фосфоротиоат
Us	уридин -3'-фосфоротиоат
N	любой нуклеотид, модифицированный или немодифицированный
a	2'-О-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-О-метиладенозин-3'- фосфоротиоат
c	2'-О-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-О-метилцитидин-3'- фосфоротиоат
g	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-О-метилгуанозин-3'- фосфоротиоат
t	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфоротиоат
s	фосфоротиоатная связь
L10	N-(холестерилкарбоксамидокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-Chol)
L96	N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил)]-4-гидроксипролинол (Нур-(GalNAc-алкил)3)
Y34	2-гидроксиметил-тетрагидрофуран-4-метокси-3-фосфат (неосновная 2'-ОМе фураноза)
Y44	обращенная основная ДНК (2-гидроксиметил-тетрагидрофуран-5-фосфат)
(Agn)	Аденозин-гликолевая нуклеиновая кислота (GNA)
(Cgn)	Цитидин-гликолевая нуклеиновая кислота (GNA)
(Ggn)	Гуанозин-гликолевая нуклеиновая кислота (GNA)
(Tgn)	тимидин-гликолевая нуклеиновая кислота (GNA) S-изомер
P	Фосфат
VP	Винил-фосфонат
dA	2'-дезоксаденозин-3'-фосфат
dAs	2'-дезоксаденозин-3'-фосфоротиоат
dC	2'-дезоксцитидин-3'-фосфат

dCs	2`-дезоксицитидин-3`-фосфоротиоат
dG	2`-дезоксигуанозин-3`-фосфат
dGs	2`-дезоксигуанозин-3`-фосфоротиоат
dT	2`-дезокситимидин-3`-фосфат
dTs	2`-дезокситимидин-3`-фосфоротиоат
dU	2`-дезоксиуридин
dUs	2`-дезоксиуридин-3`-фосфоротиоат
(C2p)	цитидин-2`-фосфат
(G2p)	гуанозин-2`-фосфат
(U2p)	уридин-2`-фосфат
(A2p)	аденозин-2`-фосфат
(Chd)	2'-О-гексадецил-цитидин-3'-фосфат
(Ahd)	2'-О-гексадецил-аденозин-3'-фосфат
(Ghd)	2'-О-гексадецил-гуанозин-3'-фосфат
(Uhd)	2'-О-гексадецил-уридин-3'-фосфат
i	2`-О-метионсин-3`-фосфат

Таблица 2. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи агентов дцРНК аполипопротеина С3

ID Дуплекса	последовательность смысловой цепи 5'-3'	SEQ Q ID NO :	Имя источника	Диапазон	последовательность антисмысловой цепи 5'-3'	SEQ ID NO:	Имя источника	Диапазон
AD-959917.1	CUUCAGUUCCCUG AAAGACUU	24	NM_000040.3_2 45-265_A21U_s	245-265	AAGUCUUUCAGGG AACUGAAGCC	25	NM_000040.3_243- 265_U1A_as	243-265
AD-959918.1	UUCAGUUCCCUGA AAGACUAU	26	NM_000040.3_2 46-266_C21U_s	246-266	AUAGUCUUUCAGG GAACUGAAGC	27	NM_000040.3_244- 266_G1A_as	244-266
AD-960096.1	CCAAUAAAGCUGG ACAAGAAU	28	NM_000040.3_5 06-526_G21U_s	506-526	AUUCUUGUCCAGC UUUAUUGGGA	29	NM_000040.3_504- 526_C1A_as	504-526
AD-960064.1	AAAAGGGACAGUA UUCUCAGU	30	NM_000040.3_4 35-455_s	435-455	ACUGAGAAUACUG UCCCUUUUAA	31	NM_000040.3_433- 455_as	433-455
AD-959914.1	AUGGCUUCAGUUC CCUGAAAU	32	NM_000040.3_2 41-261_G21U_s	241-261	AUUUCAGGGAACU GAAGCCAUCG	33	NM_000040.3_239- 261_C1A_as	239-261
AD-959941.1	AGCACCGUUAAGG ACAAGUUU	34	NM_000040.3_2 70-290_C21U_s	270-290	AAACUUGUCCUUA ACGGUGCUCC	35	NM_000040.3_268- 290_G1A_as	268-290
AD-960031.1	UAAAAGGGACAGU AUUCUCAU	36	NM_000040.3_4 34-454_G21U_s	434-454	AUGAGAAUACUGU CCCUUUUAAG	37		432-454
AD-959910.1	ACCGAUGGCUUCA GUUCCCUU	38	NM_000040.3_2 37-257_G21U_s	237-257	AAGGGAACUGAAG CCAUCGGUCA	39	NM_000040.3_235- 257_C1A_as	235-257
AD-	UAAAAGGGACAG	40	NM_000040.3_4	433-453	AGAGAAUACUGUC	41	NM_000040.3_431-	431-453

960063.1	UAUUCUCU		33-453_A21U_s		CCUUUUAAGC		453_U1A_as	
AD-959916.1	GCUUCAGUCCCU GAAAGACU	42	NM_000040.3_2 44-264_s	244-264	AGUCUUUCAGGGA ACUGAAGCCA	43	NM_000040.3_242- 264_as	242-264
AD-959913.1	GAUGGCUUCAGUU CCCUGAAU	44	NM_000040.3_2 40-260_A21U_s	240-260	AUUCAGGGAACUG AAGCCAUCGG	45	NM_000040.3_238- 260_U1A_as	238-260
AD-960066.1	AAGGGACAGUAUU CUCAGUGU	46	NM_000040.3_4 37-457_C21U_s	437-457	ACACUGAGAAUAC UGUCCCUUUU	47	NM_000040.3_435- 457_G1A_as	435-457
AD-960062.1	CUUAAAAGGGACA GUAUUCUU	48	NM_000040.3_4 32-452_C21U_s	432-452	AAGAAUACUGUCC CUUUUAAGCA	49	NM_000040.3_430- 452_G1A_as	430-452
AD-960093.1	CUCCCAAUAAAGC UGGACAAU	50	NM_000040.3_5 03-523_G21U_s	503-523	AUUGUCCAGCUUU AUUGGGAGGC	51	NM_000040.3_501- 523_C1A_as	501-523
AD-960061.1	UGCUUAAAAGGGA CAGUAUUU	52	NM_000040.3_4 30-450_C21U_s	430-450	AAAUACUGUCCCU UUUAAGCAAC	53	NM_000040.3_428- 450_G1A_as	428-450
AD-960092.1	CCUCCCAAUAAAG CUGGACAU	54	NM_000040.3_5 02-522_A21U_s	502-522	AUGUCCAGCUUUA UUGGGAGGCC	55	NM_000040.3_500- 522_U1A_as	500-522
AD-960030.1	GCUUAAAAGGGAC AGUAUUCU	56	NM_000040.3_4 31-451_s	431-451	AGAAUACUGUCCC UUUUAAGCAA	57	NM_000040.1_428- 450_as	429-451
AD-80794.6	CUUAAAAGGGACA GUAUUCUA	13	NM_000040.1 _ 433- 452_C21A_s	433-452	UAGAAUACUGUCC CUUUUAAGCA	58	NM_000040.1 _433- 452_C21A_s	433-452
AD-960095.1	CCCAAUAAAGCUG GACAAGAU	59	NM_000040.3_5 05-525_A21U_s	505-525	AUCUUGUCCAGCU UUAUUGGGAG	60	NM_000040.3_503- 525_U1A_as	503-525

AD-959938.1	CUGGAGCACCGUU AAGGACAU	61	NM_000040.3_2 66-286_A21U_s	266-286	AUGUCCUUAACGG UGCUCAGUA	62	NM_000040.3_264- 286_U1A_as	264-286
AD-960065.1	AAAGGGACAGUAU UCUCAGUU	63	NM_000040.3_4 36-456_G21U_s	436-456	AACUGAGAAUACU GUCCCUUUA	64	NM_000040.3_434- 456_C1A_as	434-456
AD-959907.1	GUGACCGAUGGCU UCAGUUCU	65	NM_000040.3_2 34-254_C21U_s	234-254	AGAACUGAAGCCA UCGGUCACCC	66	NM_000040.3_232- 254_G1A_as	232-254
AD-960094.1	UCCCAAUAAAGCU GGACAAGU	67	NM_000040.3_5 04-524_A21U_s	504-524	ACUUGUCCAGCUU UAUUGGGAGG	68	NM_000040.3_502- 524_U1A_as	502-524
AD-960060.1	GGUUGC UAAAAG GGACAGUU	69	NM_000040.3_4 27-447_A21U_s	427-447	AACUGUCCCUUUU AAGCAACCUA	70	NM_000040.3_425- 447_U1A_as	425-447
AD-959919.1	UCAGUUCCCUGAA AGACUACU	71	NM_000040.3_2 47-267_s	247-267	AGUAGUCUUUCAG GGAACUGAAG	72	NM_000040.3_245- 267_as	245-267
AD-959932.1	AGACUACUGGAGC ACCGUUAU	73	NM_000040.3_2 60-280_A21U_s	260-280	AUAACGGUGCUCC AGUAGUCUUU	74	NM_000040.3_258- 280_U1A_as	258-280
AD-959859.1	CCACCAAGACCGCC AAGGAUU	75	NM_000040.3_1 63-183_G21U_s	163-183	AAUCCUUGGCGGU CUUGGUGGCG	76	NM_000040.3_161- 183_C1A_as	161-183
AD-959908.1	UGACCGAUGGCUU CAGUUCCU	77	NM_000040.3_2 35-255_C21U_s	235-255	AGGAACUGAAGCC AUCGGUCACC	78	NM_000040.3_233- 255_G1A_as	233-255
AD-959903.1	CUGGGUGACCGAU GGCUUCAU	79	NM_000040.3_2 30-250_G21U_s	230-250	AUGAAGCCAUCGG UCACCCAGCC	80	NM_000040.3_228- 250_C1A_as	228-250
AD-960097.1	CAAUAAAGCUGGA CAAGAAGU	81	NM_000040.3_5 07-527_C21U_s	507-527	ACUUCUUGUCCAG CUUUAUUGGG	82	NM_000040.3_505- 527_G1A_as	505-527

AD-959912.1	CGAUGGCUUCAGU UCCCUGAU	83	NM_000040.3_2 39-259_A21U_s	239-259	AUCAGGGAACUGA AGCCAUCGGU	84	NM_000040.3_237- 259_U1A_as	237-259
AD-960067.1	AGGGACAGUAUUC UCAGUGCU	85	NM_000040.3_4 38-458_s	438-458	AGCACUGAGAAUA CUGUCCCUUU	86	NM_000040.3_436- 458_as	436-458
AD-959927.1	CUGAAAGACUACU GGAGCACU	87	NM_000040.3_2 55-275_C21U_s	255-275	AGUGCUCCAGUAG UCUUUCAGGG	88	NM_000040.3_253- 275_G1A_as	253-275
AD-960099.1	AUAAAGCUGGACA AGAAGCUU	89	NM_000040.3_5 09-529_G21U_s	509-529	AAGCUUCUUGUCC AGCUUUAUUG	90	NM_000040.3_507- 529_C1A_as	507-529
AD-959931.1	AAGACUACUGGAG CACCGUUU	91	NM_000040.3_2 59-279_A21U_s	259-279	AAACGGUGCUGCA GUAGUCUUUC	92	NM_000040.3_257- 279_U1A_as	257-279
AD-959879.1	UGGCUUCAGUUCC CUGAAAGU	93	NM_000040.3_2 42-262_A21U_s	242-262	ACUUUCAGGGAAC UGAAGCCAUC	94		240-262
AD-960091.1	GCCUCCCAAUAAA GCUGGACU	95	NM_000040.3_5 01-521_A21U_s	501-521	AGUCCAGCUUUAU UGGGAGGCCA	96	NM_000040.3_499- 521_U1A_as	499-521
AD-959921.1	AGUUCCCUGAAAG ACUACUGU	97	NM_000040.3_2 49-269_G21U_s	249-269	ACAGUAGUCUUUC AGGGAACUGA	98	NM_000040.3_247- 269_C1A_as	247-269
AD-960102.1	AAGCUGGACAAGA AGCUGCUU	99	NM_000040.3_5 12-532_A21U_s	512-532	AAGCAGCUUCUUG UCCAGCUUUA	100	NM_000040.3_510- 532_U1A_as	510-532
AD-80793.6	GCUGGACAAGAAG CUGCUAUA	101	NM_000040.1 _ 515- 534_G21A_s	515-534	UAUAGCAGCUUCU UGUCCAGCUU	102	NM_000040.1 _513- 534_G21A_as	513-534
AD-	CCCUGAAAGACUA	103	253-273		AGCUCCAGUAGUC	104	NM_000040.3_251-	251-273

959925.1	CUGGAGCU				UUUCAGGGAA		273_U1A_as	
AD-960098.1	AAUAAAGCUGGAC AAGAAGCU	105	NM_000040.3_5 08-528_s	508-528	AGCUUCUUGUCCA GCUUUAUUGG	106	NM_000040.3_506- 528_as	506-528
AD-959901.1	GGCUGGGUGACCG AUGGCUUU	107	NM_000040.3_2 28-248_C21U_s	228-248	AAAGCCAUCGGUC ACCCAGCCCC	108	NM_000040.3_226- 248_G1A_as	226-248
AD-959920.1	CAGUUCCCUGAAA GACUACUU	109	NM_000040.3_2 48-268_G21U_s	248-268	AAGUAGUCUUUCA GGGAACUGAA	110	NM_000040.3_246- 268_C1A_as	246-268
AD-959926.1	CCUGAAAGACUAC UGGAGCAU	111	NM_000040.3_2 54-274_C21U_s	254-274	AUGCUCAGUAGU CUUUCAGGGA	112	NM_000040.3_252- 274_G1A_as	252-274
AD-959737.1	CAUCCCUAGAGGC AGCUGCUU	113	NM_000040.3_1 1-31_C21U_s	11-31	AAGCAGCUGCCUC UAGGGAUGAA	114	NM_000040.3_9- 31_G1A_as	9-31
AD-960011.1	CUGCCUGAGACCU CAAUACCU	115	NM_000040.3_3 40-360_C21U_s	340-360	AGGUUUUGAGGUC UCAGGCAGCC	116	NM_000040.3_338- 360_G1A_as	338-360
AD-960101.1	AAAGCUGGACAAG AAGCUGCU	117	NM_000040.3_5 11-531_s	511-531	AGCAGCUUCUUGU CCAGCUUUUAU	118	NM_000040.3_509- 531_as	509-531
AD-959923.1	UUCCUGAAAGAC UACUGGAU	119	NM_000040.3_2 51-271_G21U_s	251-271	AUCCAGUAGUCUU UCAGGGAACU	120	NM_000040.3_249- 271_C1A_as	249-271
AD-960058.1	UAGGUUGC UUAAA AGGGACAU	121	NM_000040.3_4 25-445_G21U_s	425-445	AUGUCCCUUUUAA GCAACCUACA	122	NM_000040.3_423- 445_C1A_as	423-445
AD-959860.1	CACCAAGACCGCCA AGGAUGU	123	NM_000040.3_1 64-184_C21U_s	164-184	ACAUCCUUGGCGG UCUUGGUGGC	124	NM_000040.3_162- 184_G1A_as	162-184
AD-	AGGUUGC UUAAAA	125	NM_000040.3_4	426-446	ACUGUCCCUUUUA	126	NM_000040.3_424-	424-446

960059.1	GGGACAGU		26-446_s		AGCAACCUAC		446_as	
AD- 960103.1	AGCUGGACAAGAA GCUGCUAU	127	NM_000040.3_5 13-533_s	513-533	AUAGCAGCUUCUU GUCCAGCUUU	128	NM_000040.3_511- 533_as	511-533
AD- 959740.1	CCCUAGAGGCAGC UGCUCCAU	129	NM_000040.3_1 4-34_G21U_s	14-34	AUGGAGCAGCUGC CUCUAGGGAU	130	NM_000040.3_12- 34_C1A_as	12-34
AD- 959939.1	UGGAGCACCGUUA AGGACAAU	131	NM_000040.3_2 67-287_G21U_s	267-287	AUUGUCCUUAACG GUGCUCCAGU	132	NM_000040.3_265- 287_C1A_as	265-287
AD- 959865.1	GACCGCCAAGGAU GCACUGAU	133	NM_000040.3_1 70-190_G21U_s	170-190	AUCAGUGCAUCCU UGGCGGUCUU	134	NM_000040.3_168- 190_C1A_as	168-190
AD- 960100.1	UAAAGCUGGACAA GAAGCUGU	135	NM_000040.3_5 10-530_C21U_s	510-530	ACAGCUUCUUGUC CAGCUUUAUU	136	NM_000040.3_508- 530_G1A_as	508-530
AD- 959924.1	UCCCUGAAAGACU ACUGGAGU	137	NM_000040.3_2 52-272_C21U_s	252-272	ACUCCAGUAGUCU UUCAGGGAAC	138	NM_000040.3_250- 272_G1A_as	250-272
AD- 959909.1	GACCGAUGGCUUC AGUUCCCU	139	NM_000040.3_2 36-256_s	236-256	AGGGAACUGAAGC CAUCGGUCAC	140	NM_000040.3_234- 256_as	234-256
AD- 959739.1	UCCCUAGAGGCAG CUGCUCCU	141	NM_000040.3_1 3-33_A21U_s	13-33	AGGAGCAGCUGCC UCUAGGGAUG	142	NM_000040.3_11- 33_U1A_as	11-33
AD- 959911.1	CCGAUGGCUUCAG UUCCCUGU	143	NM_000040.3_2 38-258_A21U_s	238-258	ACAGGGAACUGAA GCCAUCGGUC	144	NM_000040.3_236- 258_U1A_as	236-258
AD- 960057.1	GUAGGUUGC UUA AAGGGACU	145	NM_000040.3_4 24-444_A21U_s	424-444	AGUCCCUUUUAAG CAACCUACAG	146	NM_000040.3_422- 444_U1A_as	422-444
AD-	CCUAGAGGCAGCU	147	NM_000040.3_1	15-35	ACUGGAGCAGCUG	148	NM_000040.3_13-	13-35

959741.1	GCUCCAGU		5-35_G21U_s		CCUCUAGGGA		35_C1A_as	
AD-960056.1	UGUAGGUUGCUUA AAAGGGAU	149	NM_000040.3_4 23-443_C21U_s	423-443	AUCCCUUUUAAGC AACCUACAGG	150	NM_000040.3_421- 443_G1A_as	421-443
AD-959930.1	AAAGACUACUGGA GCACCGUU	151	NM_000040.3_2 58-278_s	258-278	AACGGUGCUCCAG UAGUCUUUCA	152	NM_000040.3_256- 278_as	256-278
AD-959746.1	AGGCAGCUGCUCC AGGAACAU	153	NM_000040.3_2 0-40_G21U_s	20-40	AUGUUCUGGAGC AGCUGCCUCU	154	NM_000040.3_18- 40_C1A_as	18-40
AD-959748.1	GCAGCUGCUCCAG GAACAGAU	155	NM_000040.3_2 2-42_G21U_s	22-42	AUCUGUCCUGGA GCAGCUGCCU	156	NM_000040.3_20- 42_C1A_as	20-42
AD-959857.1	CGCCACCAAGACCG CCAAGGU	157	NM_000040.3_1 61-181_A21U_s	161-181	ACCUUGGCGGUCU UGGUGGCGUG	158	NM_000040.3_159- 181_U1A_as	159-181
AD-959935.1	CUACUGGAGCACC GUUAAGGU	159	NM_000040.3_2 63-283_A21U_s	263-283	ACCUUAACGGUGC UCCAGUAGUC	160	NM_000040.3_261- 283_U1A_as	261-283
AD-960008.1	UGGCUGCCUGAGA CCUCAAUU	161	NM_000040.3_3 37-357_A21U_s	337-357	AAUUGAGGUCUCA GGCAGCCACG	162	NM_000040.3_335- 357_U1A_as	335-357
AD-959915.1	GGCUUCAGUUCCC UGAAAGAU	163	NM_000040.3_2 43-263_C21U_s	243-263	AUCUUUCAGGGAA CUGAAGCCAU	164	NM_000040.3_241- 263_G1A_as	241-263
AD-959738.1	AUCCCUAGAGGCA GCUGCUCU	165	NM_000040.3_1 2-32_C21U_s	12-32	AGAGCAGCUGCCU CUAGGGAUGA	166	NM_000040.3_10- 32_G1A_as	08-32
AD-959928.1	UGAAAGACUACUG GAGCACCU	167	NM_000040.3_2 56-276_G21U_s	256-276	AGGUGCUCAGUA GUCUUUCAGG	168	NM_000040.3_254- 276_C1A_as	254-276
AD-	AAGACCGCCAAGG	169	NM_000040.3_1	168-188	AAGUGCAUCCUUG	170	NM_000040.3_166-	166-188

959863.1	AUGCACUU		68-188_G21U_s		GCGGUCUUGG		188_C1A_as	
AD-960010.1	GCUGCCUGAGACC UCAAUACU	171	NM_000040.3_3 39-359_C21U_s	339-359	AGUAUUGAGGUCU CAGGCAGCCA	172	NM_000040.3_337- 359_G1A_as	337-359
AD-960090.1	GGCCUCCCAAUAA AGCUGGAU	173	NM_000040.3_5 00-520_C21U_s	500-520	AUCCAGCUUUAUU GGGAGGCCAG	174	NM_000040.3_498- 520_G1A_as	498-520
AD-959732.1	CAGUUCAUCCCUA GAGGCAGU	175	NM_000040.3_6 -26_C21U_s	6-26	ACUGCCUCUAGGG AUGAACUGAG	176	NM_000040.3_4- 26_G1A_as	4-26
AD-960009.1	GGCUGCCUGAGAC CUCAAUAU	177	NM_000040.3_3 38-358_C21U_s	338-358	AUAUUGAGGUCUC AGGCAGCCAC	178	NM_000040.3_336- 358_G1A_as	336-358
AD-959929.1	GAAAGACUACUGG AGCACCGU	179	NM_000040.3_2 57-277_s	257-277	ACGGUGCUC CAGU AGUCUUUCAG	180	NM_000040.3_255- 277_as	255-277
AD-959745.1	GAGGCAGCUGCUC CAGGAACU	181	NM_000040.3_1 9-39_A21U_s	19-39	AGUUCCUGGAGCA GCUGCCUCUA	182	NM_000040.3_17- 39_U1A_as	17-39
AD-960007.1	GUGGCUGCCUGAG ACCUCAAU	183	NM_000040.3_3 36-356_s	336-356	AUUGAGGUCUCAG GCAGCCACGG	184	NM_000040.3_334- 356_as	334-356
AD-959902.1	GCUGGGUGACCGA UGGCUUCU	185	NM_000040.3_2 29-249_A21U_s	229-249	AGAAGCCAUCGGU CACCCAGCCC	186	NM_000040.3_227- 249_U1A_as	227-249
AD-959940.1	GGAGCACCGUAAA GGACAAGU	187	NM_000040.3_2 68-288_s	268-288	ACUUGUCCUUAAC GGUGCUC CAG	188	NM_000040.3_266- 288_as	266-288
AD-960055.1	CUGUAGGUUGCUU AAAAGGGU	189	NM_000040.3_4 22-442_A21U_s	422-442	ACCCUUUUAAGCA ACCUACAGGG	190	NM_000040.3_420- 442_U1A_as	420-442
AD-	GUUCCCUGAAAGA	191	NM_000040.3_2	250-270	ACCAGUAGUCUUU	192	NM_000040.3_248-	248-270

959922.1	CUACUGGU		50-270_A21U_s		CAGGGAACUG		270_U1A_as	
AD- 959900.1	GGGCUGGGUGACC GAUGGCUU	193	NM_000040.3_2 27-247_s	227-247	AAGCCAUCGGUCA CCCAGCCCCU	194	NM_000040.3_225- 247_as	225-247
AD- 959858.1	GCCACCAAGACCGC CAAGGAU	195	NM_000040.3_1 62-182_s	162-182	AUCCUUGGCGGUC UUGGUGGCGU	196	NM_000040.3_160- 182_as	160-182
AD- 959744.1	AGAGGCAGCUGCU CCAGGAU	197	NM_000040.3_1 8-38_C21U_s	18-38	AUCCUGGAGCAG CUGCCUCUAG	198	NM_000040.3_16- 38_G1A_as	16-38
AD- 959736.1	UCAUCCCUAGAGG CAGCUGCU	199	NM_000040.3_1 0-30_s	10-30	AGCAGCUGCCUCU AGGGAUGAAC	200	NM_000040.3_8- 30_as	08-30
AD- 959735.1	UUCAUCCCUAGAG GCAGCUGU	201	NM_000040.3_9 -29_C21U_s	9-29	ACAGCUGCCUCUA GGGAUGAACU	202	NM_000040.3_7- 29_G1A_as	29-Jul
AD- 960039.1	CGAGCUCCUUGGG UCCUGCAU	203	NM_000040.3_3 86-406_A21U_s	386-406	AUGCAGGACCCAA GGAGCUCGCA	204	NM_000040.3_384- 406_U1A_as	384-406
AD- 959747.1	GGCAGCUGCUCCA GGAACAGU	205	NM_000040.3_2 1-41_A21U_s	21-41	ACUGUCCUGGAG CAGCUGCCUC	206	NM_000040.3_19- 41_U1A_as	19-41
AD- 959862.1	CCAAGACCGCAA GGAUGCAU	207	NM_000040.3_1 66-186_C21U_s	166-186	AUGCAUCCUUGGC GGUCUUGGUG	208	NM_000040.3_164- 186_G1A_as	164-186
AD- 959933.1	GACUACUGGAGCA CCGUUAAU	209	NM_000040.3_2 61-281_G21U_s	261-281	AUUAACGGUGCUC CAGUAGUCUU	210	NM_000040.3_259- 281_C1A_as	259-281
AD- 959733.1	AGUUCAUCCCUAG AGGCAGCU	211	NM_000040.3_7 -27_s	7-27	AGCUGCCUCUAGG GAUGAACUGA	212	NM_000040.3_5- 27_as	5-28
AD-	ACUGGAGCACCGU	213	NM_000040.3_2	265-285	AGUCCUUAACGGU	214	NM_000040.3_263-	263-285

959937.1	UAAGGACU		65-285_A21U_s		GCUCCAGUAG		285_U1A_as	
AD- 959904.1	UGGGUGACCGAUG GCUUCAGU	215	NM_000040.3_2 31-251_s	231-251	ACUGAAGCCAUCG GUCACCCAGC	216	NM_000040.3_229- 251_as	229-251
AD- 959797.1	CCGAGCUUCAGAG GCCGAGGU	217	NM_000040.3_1 01-121_A21U_s	101-121	ACCUCGGCCUCUG AAGCUCGGGC	218	NM_000040.3_99- 121_U1A_as	99-121
AD- 959861.1	ACCAAGACCGCCA AGGAUGCU	219	NM_000040.3_1 65-185_A21U_s	165-185	AGCAUCCUUGGCG GUCUUGGUGG	220	NM_000040.3_163- 185_U1A_as	163-185
AD- 959743.1	UAGAGGCAGCUGC UCCAGGAU	221	NM_000040.3_1 7-37_A21U_s	17-37	AUCCUGGAGCAGC UGCCUCUAGG	222	NM_000040.3_15- 37_U1A_as	15-37
AD- 959905.1	GGGUGACCGAUGG CUUCAGUU	223	NM_000040.3_2 32-252_s	232-252	AACUGAAGCCAUC GGUCACCCAG	224	NM_000040.3_230- 252_as	230-252
AD- 959734.1	GUUCAUCCCUAGA GGCAGCUU	225	NM_000040.3_8 -28_G21U_s	8-28	AAGCUGCCUCUAG GGAUGAACUG	226	NM_000040.3_6- 28_C1A_as	6-28
AD- 959934.1	ACUACUGGAGCAC CGUUAAGU	227	NM_000040.3_2 62-282_G21U_s	262-282	ACUUAACGGUGCU CCAGUAGUCU	228	NM_000040.3_260- 282_C1A_as	260-282
AD- 959749.1	CAGCUGCUCCAGG AACAGAGU	229	NM_000040.3_2 3-43_G21U_s	23-43	ACUCUGUCCUGG AGCAGCUGCC	230	NM_000040.3_21- 43_C1A_as	21-43
AD- 959798.1	CGAGCUUCAGAGG CCGAGGAU	231	NM_000040.3_1 02-122_s	102-122	AUCCUCGGCCUCU GAAGCUCGGG	232	NM_000040.3_100- 122_as	100-122
AD- 959742.1	CUAGAGGCAGCUG CUCCAGGU	233	NM_000040.3_1 6-36_A21U_s	16-36	ACCUGGAGCAGCU GCCUCUAGGG	234	NM_000040.3_14- 36_U1A_as	14-36
AD- 959742.1	GAGUCCCAGGUGG	235	NM_000040.3_2	201-221	AUGCUGGGCCACC	236	NM_000040.3_199-	199-221

959897.1	CCCAGCAU		01-221_G21U_s		UGGGACUCCU		221_C1A_as	
AD- 959864.1	AGACCGCCAAGGA UGCACUGU	237	NM_000040.3_1 69-189_A21U_s	169-189	ACAGUGCAUCCU GGCGGUCUUG	238	NM_000040.3_167- 189_U1A_as	167-189
AD- 959899.1	CCAGGUGGCCAG CAGGCCAU	239	NM_000040.3_2 06-226_G21U_s	206-226	AUGGCCUGCUGGG CCACCUGGGA	240	NM_000040.3_204- 226_C1A_as	204-226
AD- 959856.1	ACGCCACCAAGACC GCCAAGU	241	NM_000040.3_1 60-180_G21U_s	160-180	ACUUGGCGGUCU GGUGGCGUGC	242	NM_000040.3_158- 180_C1A_as	158-180
AD- 959906.1	GGUGACCGAUGGC UUCAGUUU	243	NM_000040.3_2 33-253_C21U_s	233-253	AAACUGAAGCCA CGGUCACCA	244	NM_000040.3_231- 253_G1A_as	231-253
AD- 959936.1	UACUGGAGCACCG UUAAGGAU	245	NM_000040.3_2 64-284_C21U_s	264-284	AUCCUUAACGGUG CUCCAGUAGU	246	NM_000040.3_262- 284_G1A_as	262-284
AD- 959896.1	GGAGUCCAGGUG GCCAGCU	247	NM_000040.3_2 00-220_A21U_s	200-220	AGCUGGGCCACCU GGGACUCCUG	248	NM_000040.3_198- 220_U1A_as	198-220
AD- 959893.1	GCAGGAGUCCAG GUGGCCCU	249	NM_000040.3_1 97-217_A21U_s	197-217	AGGGCCACCUGGG ACUCCUGCAC	250	NM_000040.3_195- 217_U1A_as	195-217
AD- 959892.1	UGCAGGAGUCCA GGUGGCCU	251	NM_000040.3_1 96-216_C21U_s	196-216	AGGCCACCUGGGA CUCCUGCACG	252	NM_000040.3_194- 216_G1A_as	194-216
AD- 959894.1	CAGGAGUCCAGG UGGCCAU	253	NM_000040.3_1 98-218_G21U_s	198-218	AUGGGCCACCUGG GACUCCUGCA	254	NM_000040.3_196- 218_C1A_as	196-218
AD- 959750.1	AGCUGCUCAGGA ACAGAGGU	255	NM_000040.3_2 4-44_s	24-44	ACCUCUGUCCUG GAGCAGCUGC	256	NM_000040.3_22- 44_as	22-44
AD- 959897.1	AGUCCAGGUGGC	257	NM_000040.3_2	202-222	ACUGCUGGGCCAC	258	NM_000040.3_200-	200-222

959898.1	CCAGCAGU		02-222_G21U_s		CUGGGACUCC		222_C1A_as	
AD- 959895.1	AGGAGUCCCAGGU GGCCCAGU	259	NM_000040.3_1 99-219_C21U_s	199-219	ACUGGGCCACCUG GGACUCCUGC	260	NM_000040.3_197- 219_G1A_as	197-219

Таблица 3. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи агентов дцРНК аполипопротеина С3

Название дуплекса	последовательность смысловой цепи 5'-3'	SEQ ID NO:	последовательность антисмысловой цепи 5'-3'	SEQ ID NO:	Последовательность-мишень мРНК	SEQ ID NO:
AD- 959917.1	csusucagUfuCfCfCfugaaga cuuL96	341	asAfsugcUfuUfCfagggAfaCfugaagscsc	342	GGCUUCAGUUCCUGA AAGACUA	343
AD- 959918.1	ususcaguUfcCfCfUfgaaagac uauL96	344	asUfsaguCfuUfUfcaggGfaAfcugaasgsc	345	GCUUCAGUUCCUGAA AGACUAC	346
AD- 960096.1	cscsaauaAfaGfCfUfggacaag aauL96	347	asUfsucuUfgUfCfcagcUfuUfauuggsgsa	348	UCCCAAUAAAGCUGGA CAAGAAG	349
AD- 960064.1	asasaaggGfaCfAfGfuauucuc aguL96	350	asCfsugaGfaAfUfacugUfcCfcuuusasa	351	UUAAAAGGGACAGUAU UCUCAGU	352
AD- 959914.1	asusggcuUfcAfGfUfucccuga aauL96	353	asUfsuucAfgGfGfaacuGfaAfgcauscs	354	CGAUGGCUUCAGUUCC CUGAAAG	355
AD- 959941.1	asgscaccGfuUfAfAfggacaag uuuL96	356	asAfsacuUfgUfCfcuuAfcGfgugcuscsc	357	GGAGCACCGUUAAGGA CAAGUUC	358
AD- 960031.1	usasaagGfgAfCfAfguauucu cauL96	359	asUfsgagAfaUfAfcuguCfcCfuuuuasag	360	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUCAG	361
AD- 959910.1	ascscgauGfgCfUfUfcaguucc cuuL96	362	asAfsgggAfaCfUfgaagCfcAfucgguscsa	363	UGACCGAUGGCUUCAG UUCCCUG	364

AD-960063.1	ususaaaaGfgGfAfCfaguauuc ucuL96	365	asGfsagaAfuAfCfugucCfcUfuuuu aasgsc	366	GCUUAAAAGGGACAGU AUUCUCA	367
AD-959916.1	gscsuucaGfuUfCfCfcugaaag acuL96	368	asGfsucuUfuCfAfgggaAfcUf gaagcscsa	369	UGGCUUCAGUUCCCUG AAAGACU	370
AD-959913.1	gsasuggcUfuCfAfGfuuccug aauL96	371	asUfsucaGfgGfAfacugAfaGf ccaucsgsg	372	CCGAUGGCUUCAGUUC CCUGAAA	373
AD-960066.1	asasgggaCfaGfUfAfuucucag uguL96	374	asCfsacuGfaGfAfaUacUfgUf eccuususu	375	AAAAGGGACAGUAUUC UCAGUGC	376
AD-960062.1	csusuaaaAfgGfGfAfcaguauu cuuL96	377	asAfsгааUfaCfUfguccCfuUfu uaagcscsa	378	UGCUUAAAAGGGACAG UAUUCUC	379
AD-960093.1	csuscccaAfuAfAfAfgcuggac aauL96	380	asUfsuguCfcAfGfcuuuAfuUf gggagsgs c	381	GCCUCCCAAUAAAGCU GGACAAG	382
AD-960061.1	usgscuuAfaAfGfGfgacagua uuuL96	383	asAfsauaCfuGfUfccuUfuUfa agcasasc	384	GUUGC U UAAAAGGGAC AGUAUUC	385
AD-960092.1	cscsucceAfaUfAfAfgcugga cauL96	386	asUfsgucCfaGfCfuuuAfuGf ggaggscsc	387	GGCCUCCCAAUAAAGC UGGACAA	388
AD-960030.1	gscsuuaaAfaGfGfGfacaguau ucuL96	389	asGfsaaUfcUfGfuuccUfuUfu aagcsasa	390	UUGC U UAAAAGGGACA GUAUUCU	391
AD-80794.6	csusuaaaAfgGfGfAfcaguauu cuaL96	17	usAfsгааUfaCfUfguccCfuUfu uaagcscsa	392	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUA	393
AD-960095.1	cscscaauAfaAfGfCfuggacia gauL96	394	asUfscuuGfuCfCfagcuUfuAfu ugggsas g	395	CUCCCAAUAAAGCUGG ACAAGAA	396

AD-959938.1	csusggagCfaCfCfGfuuaagga cauL96	397	asUfsgucCfuUfAfacggUfgCfuccagsusa	398	UACUGGAGCACCGUUA AGGACAA	399
AD-960065.1	asasagggAfcAfGfUfauucua guuL96	400	asAfscugAfgAfAfuacuGfuCfccuuususa	401	UAAAAGGGACAGUAUU CUCAGUG	402
AD-959907.1	gsusgaccGfaUfGfGfcuucagu ucuL96	403	asGfsaacUfgAfAfgccaUfcGfgucacscsc	404	GGGUGACCGAUGGCUU CAGUUCC	405
AD-960094.1	uscsccaaUfaAfAfGfcuggaca aguL96	406	asCfsuugUfcCfAfgcuuUfaUfugggasgs g	407	CCUCCCAAUAAAGCUG GACAAGA	408
AD-960060.1	gsgsuugcUfuAfAfAfagggac aguL96	409	asAfscugUfcCfCfuuuuAfaGfcaaccsusa	410	UAGGUUGCUUAAAAGG GACAGUA	411
AD-959919.1	uscsaguuCfcCfUfGfaaagacu acuL96	412	asGfsuagUfcUfUfucagGfgAfacugasasg	413	CUUCAGUUCCCUGAAA GACUACU	414
AD-959932.1	asgsacuaCfuGfGfAfgcaccgu uauL96	415	asUfsaacGfgUfGfcuccAfgUfagucususu	416	AAAGACUACUGGAGCA CCGUUAA	417
AD-959859.1	cscsaccaAfgAfCfCfGCCAagg auuL96	418	asAfsuccUfuGfGfcgguCfuUfugguggscs g	419	CGCCACCAAGACCGCCA AGGAUG	420
AD-959908.1	usgsaccgAfuGfGfCfuucaguu ccuL96	421	asGfsgaaCfuGfAfagccAfuCfggucascsc	422	GGUGACCGAUGGCUUC AGUUCCC	423
AD-959903.1	csusggguGfaCfCfGfauggcuu cauL96	424	asUfsgaaGfcCfAfuaggUfcAfcccagscsc	425	GGCUGGGUGACCGAUG GCUUCAG	426
AD-960097.1	csasauaaAfgCfUfGfgacaaga aguL96	427	asCfsuucUfuGfUfccagCfuUfuauugsgsg	428	CCCAAUAAAGCUGGAC AAGAAGC	429

AD-959912.1	csgsauggCfuUfCfAfguuccu gauL96	430	asUfscagGfgAfAfcugaAfgCfcaucgsgsu	431	ACCGAUGGCUUCAGUU CCCUGAA	432
AD-960067.1	asgsggacAfgUfAfUfucucagu gcuL96	433	asGfscacUfgAfGfaauaCfuGfuccususu	434	AAAGGGACAGUAUUCU CAGUGCU	435
AD-959927.1	csusgaaaGfaCfUfAfcuggagc acuL96	436	asGfsugcUfcCfAfguagUfcUfuucagsgsg	437	CCCUGAAAGACUACUG GAGCACC	438
AD-960099.1	asusaaagCfuGfGfAfaagaag cuuL96	439	asAfsgeUfcUfUfguccAfgCfuuuausus g	440	CAAUAAAGCUGGACAA GAAGCUG	441
AD-959931.1	asasgacuAfcUfGfGfagcaccg uuuL96	442	asAfsacgGfuGfCfuccaGfuAfgucuususc	443	GAAAGACUACUGGAGC ACCGUUA	444
AD-959879.1	usgsgcuuCfaGfUfUfccugaa aguL96	445	asCfsuuuCfaGfGfgaacUfgAfgccasusc	446	GAUGGCUUCAGUUCCC UGAAAGA	447
AD-960091.1	gscscuccCfaAfUfAfaagcugg acuL96	448	asGfsuccAfgCfUfuuuUfgGfgaggcsca	449	UGGCCUCCCAAUAAAG CUGGACA	450
AD-959921.1	asgsuuccCfuGfAfAfaagacuac uguL96	451	asCfsaguAfgUfCfuuuCfGfgaacusgsa	452	UCAGUUCCCUGAAAGA CUACUGG	453
AD-960102.1	asasgcugGfaCfAfAfaagcug cuuL96	454	asAfsgeGfcUfUfcuugUfcCfagcuususa	455	UAAAGCUGGACAAGAA GCUGCUA	456
AD-80793.6	gscsuggaCfaAfGfAfaagcugcu auaL96	457	usAfsuagCfaGfCfuucuUfgUfccagcsusu	458	GCUGGACAAGAAGCUG CUAUUA	459
AD-959925.1	cscscugaAfaGfAfCfuacugga gcuL96	460	asGfscucCfaGfUfagucUfuUfcagggsasa	461	UUCCCUGAAAGACUAC UGGAGCA	462

AD-960098.1	asasuaaaGfcUfGfGfacaagaa gcuL96	463	asGfscuuCfuUfGfuccaGfcUfuuausgsg	464	CCAAUAAAGCUGGACA AGAAGCU	465
AD-959901.1	gsgscuggGfuGfAfCfcgaugg cuuuL96	466	asAfsagcCfaUfCfggucAfcCfcagccscsc	467	GGGGCUGGGUGACCGA UGGCUUC	468
AD-959920.1	csasguucCfcUfGfAfaagacua cuuL96	469	asAfsguaGfuCfUfuucaGfgGfaacugsasa	470	UUCAGUUCCUGAAAG ACUACUG	471
AD-959926.1	cscsugaaAfgAfCfUfacuggag cauL96	472	asUfsgcuCfcAfGfuaguCfuUfucagsgsa	473	UCCCUGAAAGACUACU GGAGCAC	474
AD-959737.1	csasuccUfaGfAfGfgcagcug cuuL96	475	asAfsgeaGfcUfGfccuUfaGfggaugsasa	476	UUCAUCCCUAGAGGCA GCUGCUC	477
AD-960011.1	csusgccuGfaGfAfCfcucaaua ccuL96	478	asGfsguaUfuGfAfggucUfcAfggcagscsc	479	GGCUGCCUGAGACCUC AAUACCC	480
AD-960101.1	asasagcuGfgAfCfAfagaagcu gcuL96	481	asGfscagCfuUfCfuuguCfcAfgcuuasasu	482	AUAAAGCUGGACAAGA AGCUGCU	483
AD-959923.1	ususcccuGfaAfAfGfacuacug gauL96	484	asUfsccaGfuAfGfucuuUfcAfgggaascsu	485	AGUUCCCUGAAAGACU ACUGGAG	486
AD-960058.1	usasgguuGfcUfUfAfaaagga cauL96	487	asUfsgucCfcUfUfuuaaGfcAfaccuascsa	488	UGUAGGUUGCUUAAAA GGGACAG	489
AD-959860.1	csasccaaGfaCfCfGfccaagga uguL96	490	asCfsaucCfuUfGfgcggUfcUfuggugsgsc	491	GCCACCAAGACCGCCAA GGAUGC	492
AD-960059.1	asgsuugCfuUfAfAfaagggac aguL96	493	asCfsuguCfcCfUfuuaaAfgCfaaccusasc	494	GUAGGUUGCUUAAAAG GGACAGU	495

AD-960103.1	asgscuggAfcAfAfGfaagcugc uauL96	496	asUfsagcAfgCfUfucuuGfuCfcagcususu	497	AAAGCUGGACAAGAAG CUGCUAU	498
AD-959740.1	cscscuagAfgGfCfAfgcugcuc cauL96	499	asUfsggaGfcAfGfcugcCfuCfuagggsasu	500	AUCCCUAGAGGCAGCU GCUCCAG	501
AD-959939.1	usgsgagcAfcCfGfUfuaaggac aauL96	502	asUfsuguCfcUfUfaacgGfuGfuccasgsu	503	ACUGGAGCACCGUUA GGACAAG	504
AD-959865.1	gsasccgcCfaAfGfGfaugcacu gauL96	505	asUfscagUfgCfAfuccuUfgGfcggucsusu	506	AAGACCGCCAAGGAUG CACUGAG	507
AD-960100.1	usasaagcUfgGfAfCfaagaagc uguL96	508	asCfsagcUfuCfUfugucCfaGfcuuuasusu	509	AAUAAAGCUGGACAAG AAGCUGC	510
AD-959924.1	uscscugAfaAfGfAfcuacugg aguL96	511	asCfsuccAfgUfAfgucuUfuCfagggasasc	512	GUUCCUGAAAGACUA CUGGAGC	513
AD-959909.1	gsasccgaUfgGfCfUfucaguuc ccuL96	514	asGfsggaAfcUfGfaagcCfaUfcggucsasc	515	GUGACCGAUGGCUUCA GUUCCCU	516
AD-959739.1	uscscuaGfaGfGfCfagcugcu ccuL96	517	asGfsgagCfaGfCfugccUfcUfagggasusg	518	CAUCCCUAGAGGCAGC UGCUGCA	519
AD-959911.1	cscsgaugGfcUfUfCfaguucc uguL96	520	asCfsaggGfaAfCfugaaGfcCfaucggsusc	521	GACCGAUGGCUUCAGU UCCUGA	522
AD-960057.1	gsusagguUfgCfUfUfaaaaggg acuL96	523	asGfsuccCfuUfUfuaagCfaAfccuacsasg	524	CUGUAGGUUGCUUAAA AGGGACA	525
AD-959741.1	cscsuagaGfgCfAfGfcugcucc aguL96	526	asCfsuggAfgCfAfgcugCfcUfcuaggsgsa	527	UCCCUAGAGGCAGCUG CUCCAGG	528

AD-960056.1	usgsuaggUfuGfCfUfuaaaagg gauL96	529	asUfscceUfuUfUfaagcAfaCfcuacasgsg	530	CCUGUAGGUUGCUUAA AAGGGAC	531
AD-959930.1	asasagacUfaCfUfGfgagcacc guuL96	532	asAfscggUfgCfUfccagUfaGfucuuuscsa	533	UGAAAGACUACUGGAG CACCGUU	534
AD-959746.1	asgsgcagCfuGfCfUfccaggaa cauL96	535	asUfsguuCfcUfGfgagcAfgCfugccuscsu	536	AGAGGCAGCUGCUCCA GGAACAG	537
AD-959748.1	gscsagcuGfcUfCfCfaggaaca gauL96	538	asUfscugUfuCfCfuggaGfcAfgcugcscsu	539	AGGCAGCUGCUCCAGG AACAGAG	540
AD-959857.1	csgsccacCfaAfGfAfccgcaa gguL96	541	asCfscuuGfgCfGfgucuUfgGfuggegsus g	542	CACGCCACCAAGACCGC CAAGGA	543
AD-959935.1	csusacugGfaGfCfAfccguuaa gguL96	544	asCfscuuAfaCfGfgugcUfcCfaguagsusc	545	GACUACUGGAGCACCG UUAAGGA	546
AD-960008.1	usgsgcugCfcUfGfAfgaccuca auuL96	547	asAfsuugAfgGfUfcucaGfgCfagccascsg	548	CGUGGCUGCCUGAGAC CUCAAUA	549
AD-959915.1	gsgscuucAfgUfUfCfccugaaa gauL96	550	asUfscuuUfcAfGfggaaCfuGfaagccsas	551	AUGGCUUCAGUUCCCU GAAAGAC	552
AD-959738.1	asusccuAfgAfGfGfcagcugc ucuL96	553	asGfsagcAfgCfUfgccuCfuAfgggausgsa	554	UCAUCCCUAGAGGCAG CUGCUC	555
AD-959928.1	usgsaaagAfcUfAfCfuggagca ccuL96	556	asGfsgugCfuCfCfaguaGfuCfuucasgsg	557	CCUGAAAGACUACUGG AGCACCG	558
AD-959863.1	asasgaccGfcCfAfAfggaugca cuuL96	559	asAfsugCfaUfCfcuugGfcGfgucuusgs g	560	CCAAGACCGCCAAGGA UGCACUG	561

AD-960010.1	gscsugccUfgAfGfAfccucaa acuL96	562	asGfsuauUfgAfGfgucuCfaGfgcagcscsa	563	UGGCUGCCUGAGACCU CAAUACC	564
AD-960090.1	gsgscucCfcAfAfUfaagcug gauL96	565	asUfsccaGfcUfUfuauuGfgGfaggccsasg	566	CUGGCCUCCAAUAAA GCUGGAC	567
AD-959732.1	csasguucAfuCfCfCfuagaggc aguL96	568	asCfsugcCfuCfUfagggAfuGfaacugsasg	569	CUCAGUUCAUCCCUAG AGGCAGC	570
AD-960009.1	gsgscugcCfuGfAfGfaccucaa uauL96	571	asUfsauuGfaGfGfucucAfgGfcagccsasc	572	GUGGCUGCCUGAGACC UCAAUAC	573
AD-959929.1	gsasaagaCfuAfCfUfggagcac cguL96	574	asCfsgguGfcUfCfcaguAfgUfcuuucsasg	575	CUGAAAGACUACUGGA GCACCGU	576
AD-959745.1	gsasggcaGfcUfGfCfuccagga acuL96	577	asGfsuucCfuGfGfagcaGfcUfgccucsusa	578	UAGAGGCAGCUGCUCC AGGAACA	579
AD-960007.1	gsusggcuGfcCfUfGfagaccuc aauL96	580	asUfsugaGfgUfCfucagGfcAfgccacsgsg	581	CCGUGGCUGCCUGAGA CCUCAAU	582
AD-959902.1	gscsugggUfgAfCfCfgauggc uucuL96	583	asGfsaagCfcAfUfcgguCfaCfccagcscsc	584	GGGCUGGGUGACCGAU GGCUUCA	585
AD-959940.1	gsgsagcaCfcGfUfUfaaggaca aguL96	586	asCfsuugUfcCfUfuaacGfgUfgcuccsasg	587	CUGGAGCACCGUUAAG GACAAGU	588
AD-960055.1	csusguagGfuUfGfCfuuaaaag gguL96	589	asCfscuUfuUfAfagcaAfcCfuacagsgsg	590	CCCUGUAGGUUGCUUA AAAGGGA	591
AD-959922.1	gsusucccUfgAfAfAfgacuacu gguL96	592	asCfscagUfaGfUfcuuuCfaGfggaacsusg	593	CAGUUCCCUGAAAGAC UACUGGA	594

AD-959900.1	gsgsgcugGfgUfGfAfccgaug gcuuL96	595	asAfsgccAfuCfGfgucaCfcCfagccscsu	596	AGGGGCUGGGUGACCG AUGGCUU	597
AD-959858.1	gscscaccAfaGfAfCfcgccaag gauL96	598	asUfscuUfgGfCfggucUfuGfguggcsgs u	599	ACGCCACCAAGACCGCC AAGGAU	600
AD-959744.1	asgsaggcAfgCfUfGfcuccagg aauL96	601	asUfsuccUfgGfAfgcagCfuGfccucusasg	602	CUAGAGGCAGCUGCUC CAGGAAC	603
AD-959736.1	uscsauccCfuAfGfAfggcagcu gcuL96	604	asGfscagCfuGfCfcucuAfgGfgaugasasc	605	GUUCAUCCCUAGAGGC AGCUGCUC	606
AD-959735.1	ususcaucCfcUfAfGfaggcagc uguL96	607	asCfsagcUfgCfCfucuaGfgGfauagaascsu	608	AGUUCAUCCCUAGAGG CAGCUGC	609
AD-960039.1	csgsagcuCfcUfUfGfgguccug cauL96	610	asUfsgcaGfgAfCfcaaGfgAfgcucgscsa	611	UGCGAGCUCCUUGGGU CCUGCAA	612
AD-959747.1	gsgscagcUfgCfUfCfcaggaac aguL96	613	asCfsuguUfcCfUfggagCfaGfcugccsusc	614	GAGGCAGCUGCUCACCAG GAACAGA	615
AD-959862.1	cscsaagaCfcGfCfCfaaggaug cauL96	616	asUfsgcaUfcCfUfuggcGfgUfcuuggsus g	617	CACCAAGACCGCCAAGG AUGCAC	618
AD-959933.1	gsascuacUfgGfAfGfcaccguu aauL96	619	asUfsuaaCfgGfUfgcucCfaGfuagucsusu	620	AAGACUACUGGAGCAC CGUUAAG	621
AD-959733.1	asgsuucaUfcCfCfUfagaggca gcuL96	622	asGfscugCfcUfCfuaggGfaUfgaacusgsa	623	UCAGUUCAUCCCUAGA GGCAGCU	624
AD-959937.1	ascsuggaGfcAfCfCfguuaagg acuL96	625	asGfsuccUfuAfAfcgguGfcUfccagusasg	626	CUACUGGAGCACCGUU AAGGACA	627

AD-959904.1	usgsggugAfcCfGfAfuggccu caguL96	628	asCfsugaAfgCfCfaucgGfuCfaccasgsc	629	GCUGGGUGACCGAUGG CUUCAGU	630
AD-959797.1	cscsgagcUfuCfAfGfaggccga gguL96	631	asCfscucGfgCfCfucugAfaGfcucggsgsc	632	GCCCGAGCUUCAGAGG CCGAGGA	633
AD-959861.1	ascscagAfcCfGfCfcaaggau gcuL96	634	asGfscuAfcUfUfggcgGfuCfuuggusgs g	635	CCACCAAGACCGCCAAG GAUGCA	636
AD-959743.1	usasgaggCfaGfCfUfgcuccag gauL96	637	asUfscuGfgAfGfcagcUfgCfcucuasgsg	638	CCUAGAGGCAGCUGCU CCAGGAA	639
AD-959905.1	gsgsgugaCfcGfAfUfggcuuca guuL96	640	asAfcscugAfaGfCfcaucGfgUfcaccsasg	641	CUGGGUGACCGAUGGC UUCAGUU	642
AD-959734.1	gsusucacCfcCfUfAfgaggcag cuuL96	643	asAfcscuGfcCfUfcuagGfgAfugaacsusg	644	CAGUUCAUCCCUAGAG GCAGCUG	645
AD-959934.1	ascsuacuGfgAfGfCfacgguua aguL96	646	asCfsuuaAfcGfGfugcuCfcAfguaguscsu	647	AGACUACUGGAGCACC GUUAAGG	648
AD-959749.1	csasgcugCfuCfCfAfggaacag aguL96	649	asCfsucuGfuUfCfcuggAfgCfagcugscsc	650	GGCAGCUGCUCCAGGA ACAGAGG	651
AD-959798.1	csgsagcuUfcAfGfAfggcccag gauL96	652	asUfscuUfcGfCfcucuGfaAfgcucggsgsg	653	CCCAGAGCUUCAGAGGCC GAGGAU	654
AD-959742.1	csusagagGfcAfGfCfugcucca gguL96	655	asCfscugGfaGfCfagcuGfcCfucuasgsgsg	656	CCCUAGAGGCAGCUGC UCCAGGA	657
AD-959897.1	gsasguccCfaGfGfUfggcccag cauL96	658	asUfscuGfgGfCfcaccUfgGfgacucscsu	659	AGGAGUCCAGGUGGC CCAGCAG	660

AD-959864.1	asgsaccgCfcAfAfGfgaugcac uguL96	661	asCfsaguGfcAfUfccuuGfgCfggucususg	662	CAAGACCGCCAAGGAU GCACUGA	663
AD-959899.1	cscsagguGfgCfCfCfagcaggc cauL96	664	asUfsggcCfuGfCfugggCfcAfccuggsgsa	665	UCCCAGGUGGCCAGCA GGCCAG	666
AD-959856.1	ascsgccaCfcAfAfGfaccgcca aguL96	667	asCfsuugGfcGfGfucuuGfgUfggcusgs c	668	GCACGCCACCAAGACCG CCAAGG	669
AD-959906.1	gsgsugacCfgAfUfGfgcuucag uuuL96	670	asAfsacuGfaAfGfccauCfGfucaccscsa	671	UGGGUGACCGAUGGCU UCAGUUC	672
AD-959936.1	usascuggAfgCfAfCfcguuaag gauL96	673	asUfscuUfaAfCfggugCfuCfcaguasgsu	674	ACUACUGGAGCACCGU UAAGGAC	675
AD-959896.1	gsgsagucCfcAfGfGfuggccca gcuL96	676	asGfscugGfgCfCfaccuGfgGfacuccsusg	677	CAGGAGUCCCAGGUGG CCCAGCA	678
AD-959893.1	gscsaggaGfuCfCfCfagguggc ccuL96	679	asGfsggcCfaCfCfugggAfcUfccugcsasc	680	GUGCAGGAGUCCCAGG UGGCCCA	681
AD-959892.1	usgscaggAfgUfCfCfcaggugg ccuL96	682	asGfsgccAfcCfUfgggaCfuCfcugcascsg	683	CGUGCAGGAGUCCCAG GUGGCC	684
AD-959894.1	csasggagUfcCfCfAfgguggcc cauL96	685	asUfsgggCfcAfCfcuggGfaCfuccugscsa	686	UGCAGGAGUCCCAGGU GGCCCAG	687
AD-959750.1	asgscugcUfcCfAfGfgaacaga gguL96	688	asCfscucUfgUfUfccugGfaGfcagcusgsc	689	GCAGCUGCUCCAGGAA CAGAGGU	690
AD-959898.1	asgsuccAfgGfUfGfgcccage aguL96	691	asCfsugcUfgGfGfccacCfuGfggacuscs	692	GGAGUCCCAGGUGGCC CAGCAGG	693

AD-959895.1	asgsgaguCfcCfAfGfguggccc aguL96	694	asCfsuggGfcCfAfccugGfgAfcuccusgsc	695	GCAGGAGUCCCAGGUG GCCCAGC	696
-------------	------------------------------------	-----	-----------------------------------	-----	-----------------------------	-----

Таблица 4. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи агентов дцРНК аполипопротеина С3

Название дуплекса	последовательность смысловой цепи 5'-3'	SEQ ID NO:	Диапазон в NM__000040. 3	последовательность антисмысловой цепи 5'-3'	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_000040. 3
AD-960293.1	CUUCAGUCCCUGAAAG ACUU	24	245-265	AAGUCUTUCAGGGAACUGA AGCC	261	243-265
AD-960288.1	GAUGGCUUCAGUCCCCU GAAU	44	240-260	AUUCAGGGAACUGAAGCCA UCGG	45	238-260
AD-960445.1	AAGGGACAGUAUUCUC AGUGU	46	437-457	ACACUGAGAAUACUGUCCC UUUU	47	435-457
AD-960292.1	GCUUCAGUCCCUGAAA GACU	42	244-264	AGUCUUTCAGGGAACUGAA GCCA	262	242-264
AD-960475.1	CCAAUAAAGCUGGACAA GAAU	28	506-526	AUUCUUGUCCAGCUUUAUU GGGA	29	504-526
AD-960442.1	UAAAAGGGACAGUAUU CUCAU	36	434-454	AUGAGAAUACUGUCCCUUU UAAG	37	432-454
AD-960470.1	GCCUCCCAAUAAAGCUG GACU	95	501-521	AGUCCAGCUUUAUUGGGAG GCCA	96	499-521
AD-960436.1	GUUGC UUA AAAAGGGAC AGUAU	263	428-448	AUACUGTCCCUUUUAAGCAA CCU	264	426-448
AD-960446.1	AGGGACAGUAUUCUCA	85	438-458	AGCACUGAGAAUACUGUCC	86	436-458

	GUGCU			CUUU		
AD-960474.1	CCCAAUAAAGCUGGACA AGAU	59	505-525	AUCUUGTCCAGCUUUAUUG GGAG	265	503-525
AD-960294.1	UUCAGUUCCCUGAAAGA CUAU	26	246-266	AUAGUCTUUCAGGGAACUG AAGC	266	244-266
AD-960471.1	CCUCCCAAUAAAGCUGG ACAU	54	502-522	AUGUCCAGCUUUAUUGGGA GGCC	55	500-522
AD-960314.1	CUGGAGCACCGUUAAGG ACAU	61	266-286	AUGUCCTUAACGGUGCUGCA GUA	267	264-286
AD-960443.1	AAAAGGGACAGUAUUC UCAGU	30	435-455	ACUGAGAAUACUGUCCCUU UUAA	31	433-455
AD-960282.1	GUGACCGAUGGCUUCAG UUCU	65	234-254	AGAACUGAAGCCAUCGGUC ACCC	66	232-254
AD-960283.1	UGACCGAUGGCUUCAGU UCCU	77	235-255	AGGAACTGAAGCCAUCGGUC ACC	268	233-255
AD-80794.7	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUA	13	432-450	UAGAAUACUGUCCCUUUUA AGCA	58	430-450
AD-960295.1	UCAGUUCCCUGAAAGAC UACU	71	247-267	AGUAGUCUUUCAGGGAACU GAAG	72	245-267
AD-960478.1	AUAAAGCUGGACAAGA AGCUU	89	509-529	AAGCUUCUUGUCCAGCUUU AUUG	90	507-529
AD-960289.1	AUGGCUUCAGUUCCUG	32	241-261	AUUUCAGGGAACUGAAGCC	33	239-261

	AAAU			AUCG		
AD-960481.1	AAGCUGGACAAGAAGC UGCUU	99	512-532	AAGCAGCUUCUUGUCCAGC UUUA	100	510-532
AD-960318.1	AGCACCGUUAAGGACAA GUUU	34	270-290	AAACUUGUCCUUAACGGUG CUCC	35	268-290
AD-960297.1	AGUUCCCUGAAAGACUA CUGU	97	249-269	ACAGUAGUCUUUCAGGGAA CUGA	98	247-269
AD-960477.1	AAUAAAGCUGGACAAG AAGCU	105	508-528	AGCUUCTUGUCCAGCUUUAU UGG	269	506-528
AD-960317.1	GAGCACCGUUAAGGACA AGUU	270	269-289	AACUUGTCCUUAACGGUGCU CCA	271	267-289
AD-960476.1	CAAUAAAGCUGGACAA GAAGU	81	507-527	ACUUCUTGUCCAGCUUUAAU GGG	272	505-527
AD-960241.1	GACCGCCAAGGAUGCAC UGAU	133	170-190	AUCAGUGCAUCCUUGGCGG UCUU	134	168-190
AD-960480.1	AAAGCUGGACAAGAAG CUGCU	117	511-531	AGCAGCTUCUUGUCCAGCUU UAU	273	509-531
AD-960482.1	AGCUGGACAAGAAGCU GCUAU	127	513-533	AUAGCAGCUUCUUGUCCAG CUUU	128	511-533
AD-80793.7	GCUGGACAAGAAGCUGC UAUA	101	514-533	UAUAGCAGCUUCUUGUCCA GCUU	102	512-533
AD-960107.1	CAGUUCAUCCCUAGAGG	175	6-26	ACUGCCTCUAGGGAUGAACU	274	6-26

	CAGU			GAG		
AD-960308.1	AGACUACUGGAGCACCG UUAU	73	260-280	AUAACGGUGCUCCAGUAGU CUUU	74	258-280
AD-960121.1	AGGCAGCUGCUCCAGGA ACAU	153	20-40	AUGUUCCUGGAGCAGCUGC CUCU	154	18-40
AD-960287.1	CGAUGGCUUCAGUUCCC UGAU	83	239-259	AUCAGGGAACUGAAGCCAU CGGU	84	237-259
AD-960473.1	UCCCAAUAAAGCUGGAC AAGU	67	504-524	ACUUGUCCAGCUUUAUUGG GAGG	68	502-524
AD-960479.1	UAAAGCUGGACAAGAA GCUGU	135	510-530	ACAGCUTCUUGUCCAGCUUU AUU	275	508-530
AD-960278.1	CUGGGUGACCGAUGGCU UCAU	79	230-250	AUGAAGCCAUCGGUCACCCA GCC	80	228-250
AD-960113.1	AUCCCUAGAGGCAGCUG CUCU	165	12-32	AGAGCAGCUGCCUCUAGGG AUGA	166	10-32
AD-960472.1	CUCCCAAUAAAGCUGGA CAAU	50	503-523	AUUGUCCAGCUUUAUUGGG AGGC	51	501-523
AD-960444.1	AAAGGGACAGUAUUCU CAGUU	63	436-456	AACUGAGAAUACUGUCCCU UUUA	64	434-456
AD-960303.1	CUGAAAGACUACUGGA GCACU	87	255-275	AGUGCUCAGUAGUCUUUC AGGG	88	253-275
AD-960438.1	UGCUUAAAAGGGACAG	52	430-450	AAAUACTGUCCCUUUAAGC	276	428-450

	UAUUU			AAC		
AD-960290.1	UGGCUUCAGUUCCCUGA AAGU	93	242-262	ACUUUCAGGGAACUGAAGC CAUC	94	240-262
AD-960304.1	UGAAAGACUACUGGAG CACCU	167	256-276	AGGUGCTCCAGUAGUCUUUC AGG	277	254-276
AD-960388.1	CUGCCUGAGACCUCAAU ACCU	115	340-360	AGGUAUTGAGGUCUCAGGC AGCC	278	338-360
AD-960233.1	GCCACCAAGACCGCCAA GGAU	195	162-182	AUCCUUGGCGGUCUUGGUG GCGU	196	160-182
AD-960234.1	CCACCAAGACCGCCAAG GAUU	75	163-183	AAUCCUTGGCGGUCUUGGU GGCG	279	161-183
AD-960114.1	UCCCUAGAGGCAGCUGC UCCU	141	13-33	AGGAGCAGCUGCCUCUAGG GAUG	142	11-33
AD-960296.1	CAGUUCCUGAAAGACU ACUU	109	248-268	AAGUAGTCUUUCAGGGAAC UGAA	280	246-268
AD-960431.1	UGUAGGUUGC UAAAA GGGAU	149	423-443	AUCCUTUUAAGCAACCUAC AGG	281	421-443
AD-960316.1	GGAGCACCGUUAAGGAC AAGU	187	268-288	ACUUGUCCUUAACGGUGCU CCAG	188	266-288
AD-960307.1	AAGACUACUGGAGCACC GUUU	91	259-279	AAACGGTGCUCCAGUAGUCU UUC	282	257-279
AD-960120.1	GAGGCAGCUGCUCCAGG	181	19-39	AGUUCCTGGAGCAGCUGCCU	283	17-39

	AACU			CUA		
AD-960238.1	CAAGACCGCCAAGGAUG CACU	284	167-187	AGUGCATCCUUGGCGGUCUU GGU	285	165-187
AD-960301.1	CCCUGAAAGACUACUGG AGCU	103	253-273	AGCUCCAGUAGUCUUUCAG GGAA	104	251-273
AD-960235.1	CACCAAGACCGCCAAGG AUGU	123	164-184	ACAUCCTUGGCGGUCUUGGU GGC	286	162-184
AD-960123.1	GCAGCUGCUCCAGGAAC AGAU	155	22-42	AUCUGUTCCUGGAGCAGCUG CCU	287	20-42
AD-960300.1	UCCCUGAAAGACUACUG GAGU	137	252-272	ACUCCAGUAGUCUUUCAGG GAAC	138	250-272
AD-960285.1	ACCGAUGGCUUCAGUUC CCUU	38	237-257	AAGGGAACUGAAGCCAUCG GUCA	39	235-257
AD-960469.1	GGCCUCCAAUAAAGCU GGAU	173	500-520	AUCCAGCUUUAUUGGGAGG CCAG	174	498-520
AD-960387.1	GCUGCCUGAGACCUCAA UACU	171	339-359	AGUAUUGAGGUCUCAGGCA GCCA	172	337-359
AD-960384.1	GUGGCUGCCUGAGACCU CAAU	183	336-356	AUUGAGGUCUCAGGCAGCC ACGG	184	334-356
AD-960109.1	GUUCAUCCCUAGAGGCA GCUU	225	10-28	AAGCUGCCUCUAGGGAUGA ACUG	226	6-28
AD-960112.1	CAUCCCUAGAGGCAGCU	113	11-31	AAGCAGCUGCCUCUAGGGA	114	9-31

	GCUU			UGAA		
AD-960386.1	GGCUGCCUGAGACCUCA AUAU	177	338-358	AUAUUGAGGUCUCAGGCAG CCAC	178	336-358
AD-960302.1	CCUGAAAGACUACUGGA GCAU	111	254-274	AUGCUCAGUAGUCUUUCA GGGA	112	252-274
AD-960118.1	UAGAGGCAGCUGCUCCA GGAU	221	17-37	AUCCUGGAGCAGCUGCCUCU AGG	222	15-37
AD-960111.1	UCAUCCCUAGAGGCAGC UGCU	199	10-30	AGCAGCTGCCUCUAGGGAUG AAC	288	8-30
AD-960299.1	UUCCUGAAAGACUACU GGAU	119	251-271	AUCCAGTAGUCUUUCAGGG AACU	289	249-271
AD-960115.1	CCCUAGAGGCAGCUGCU CCAU	129	14-34	AUGGAGCAGCUGCCUCUAG GGAU	130	12-34
AD-960439.1	GCUUAAAAGGGACAGU AUUCU	56	431-451	AGAAUACUGUCCCUUUUAA GCAA	57	429-451
AD-960441.1	UUAAAAGGGACAGUAU UCUCU	40	433-453	AGAGAATACUGUCCCUUUU AAGC	290	431-453
AD-960232.1	CGCCACCAAGACCGCCA AGGU	157	161-181	ACCUUGGCGGUCUUGGUGG CGUG	158	159-181
AD-960276.1	GGCUGGGUGACCGAUG GCUUU	107	228-248	AAAGCCAUCGGUCACCCAGC CCC	108	226-248
AD-960435.1	GGUUGC U UAAAAGGGA	69	427-447	AACUGUCCCUUUUAAGCAA	70	425-447

	CAGUU			CCUA		
AD-960306.1	AAAGACUACUGGAGCAC CGUU	151	258-278	AACGGUGCUCCAGUAGUCU UUCA	152	256-278
AD-960172.1	CCGAGCUUCAGAGGCCG AGGU	217	101-121	ACCUCGGCCUCUGAAGCUCG GGC	218	99-121
AD-960385.1	UGGCUGCCUGAGACCUC AAUU	161	337-357	AAUUGAGGUCUCAGGCAGC CACG	162	335-357
AD-960110.1	UUCAUCCCUAGAGGCAG CUGU	201	9-29	ACAGCUGCCUCUAGGGAUG AACU	202	7-29
AD-960116.1	CCUAGAGGCAGCUGCUC CAGU	147	15-35	ACUGGAGCAGCUGCCUCUA GGGA	148	13-35
AD-960434.1	AGGUUGC UUAAAAGGG ACAGU	125	426-446	ACUGUCCCUUUUAAGCAACC UAC	126	424-446
AD-960430.1	CUGUAGGUUGC UUAAA AGGGU	189	422-442	ACCCUUTUAAGCAACCUACA GGG	291	420-442
AD-960305.1	GAAAGACUACUGGAGC ACCGU	179	257-277	ACGGUGCUCCAGUAGUCUU UCAG	180	255-277
AD-960279.1	UGGGUGACCGAUGGCU UCAGU	215	231-251	ACUGAAGCCAUCGGUCACCC AGC	216	229-251
AD-960298.1	GUUCCUGAAAGACUAC UGGU	191	250-270	ACCAGUAGUCUUUCAGGGA ACUG	192	248-270
AD-960284.1	GACCGAUGGCUUCAGUU	139	236-256	AGGGAACUGAAGCCAUCGG	140	234-256

	CCCU			UCAC		
AD-960313.1	ACUGGAGCACCGUUAAG GACU	213	265-285	AGUCCUTAACGGUGCUCCAG UAG	292	263-285
AD-960432.1	GUAGGUUGCUUAAAAG GGACU	145	424-444	AGUCCCTUUUAAGCAACCUA CAG	293	422-444
AD-960124.1	CAGCUGCUCCAGGAACA GAGU	229	23-43	ACUCUGTUCCUGGAGCAGCU GCC	294	21-43
AD-960119.1	AGAGGCAGCUGCUCCAG GAAU	197	18-38	AUUCUGGAGCAGCUGCCUC UAG	198	16-38
AD-960437.1	UUGC U U A A A A G G G A C A GUAUU	295	429-449	AAUACUGUCCCUUUUAAGC AACC	296	427-449
AD-960315.1	UGGAGCACCGUUAAGG ACAAU	131	267-287	AUUGUCCUUAACGGUGCUC CAGU	132	265-287
AD-960117.1	CUAGAGGCAGCUGCUCC AGGU	233	16-36	ACCUGGAGCAGCUGCCUCUA GGG	234	14-36
AD-960311.1	CUACUGGAGCACCGUUA AGGU	159	263-283	ACCUUAACGGUGCUCCAGU AGUC	160	261-283
AD-960272.1	GAGUCCCAGGUGGCCCA GCAU	235	201-221	AUGCUGGGCCACCUGGGAC UCCU	236	199-221
AD-960414.1	CGAGCUCCUUGGGUCCU GCAU	203	386-406	AUGCAGGACCCAAGGAGCU CGCA	204	384-406
AD-960240.1	AGACCGCCAAGGAUGCA	237	169-189	ACAGUGCAUCCUUGGCGGU	238	167-189

	CUGU			CUUG		
AD-960286.1	CCGAUGGCUUCAGUUCC CUGU	143	238-258	ACAGGGAACUGAAGCCAUC GGUC	144	236-258
AD-960281.1	GGUGACCGAUGGCUUCA GUUU	243	233-253	AAACUGAAGCCAUCGGUCA CCCA	244	231-253
AD-960277.1	GCUGGGUGACCGAUGGC UUCU	185	229-249	AGAAGCCAUCGGUCACCCAG CCC	186	227-249
AD-960274.1	CCAGGUGGCCCAGCAGG CCAU	239	206-226	AUGGCCTGCUGGGCCACCUG GGA	297	204-226
AD-960108.1	AGUUCAUCCCUAGAGGC AGCU	211	11-27	AGCUGCCUCUAGGGAUGAA CUGA	212	11-27
AD-960239.1	AAGACCGCCAAGGAUGC ACUU	169	168-188	AAGUGCAUCCUUGGCGGUC UUGG	170	166-188
AD-960122.1	GGCAGCUGCUCAGGAA CAGU	205	21-41	ACUGUCCUGGAGCAGCUG CCUC	206	19-41
AD-960291.1	GGCUUCAGUCCCUGAA AGAU	163	243-263	AUCUUUCAGGGAACUGAAG CCAU	164	241-263
AD-960125.1	AGCUGCUCAGGAACAG AGGU	255	24-44	ACCUCUGUCCUGGAGCAGC UGC	256	22-44
AD-960231.1	ACGCCACCAAGACCGCC AAGU	241	160-180	ACUUGGCGGUCUUGGUGGC GUGC	242	158-180
AD-960275.1	GGGCUGGGUGACCGAU	193	227-247	AAGCCATCGGUCACCCAGCC	298	225-247

	GGCUU			CCU		
AD-960173.1	CGAGCUUCAGAGGCCGA GGAU	231	102-122	AUCCUCGGCCUCUGAAGCUC GGG	232	100-122
AD-960271.1	GGAGUCCCAGGUGGCC AGCU	247	200-220	AGCUGGGCCACCUGGGACUC CUG	248	198-220
AD-960433.1	UAGGUUGC U UAAAAGG GACAU	121	425-445	AUGUCCCUUUUAAGCAACC UACA	122	423-445
AD-960267.1	UGCAGGAGUCCCAGGUG GCCU	251	196-216	AGGCCACCUGGGACUCCUGC ACG	252	194-216
AD-960236.1	ACCAAGACCGCCAAGGA UGCU	219	165-185	AGCAUCCUUGGCGGUCUUG GUGG	220	163-185
AD-960310.1	ACUACUGGAGCACCGUU AAGU	227	262-282	ACUUAACGGUGCUCCAGUA GUCU	228	260-282
AD-960312.1	UACUGGAGCACCGUUA GGAU	245	264-284	AUCCUUAACGGUGCUCCAG UAGU	246	262-284
AD-960309.1	GACUACUGGAGCACCGU UAAU	209	261-281	AUUAACGGUGCUCCAGUAG UCUU	210	259-281
AD-960440.1	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUU	48	432-452	AAGAAUACUGUCCCUUUUA AGCA	49	430-452
AD-960237.1	CCAAGACCGCCAAGGAU GCAU	207	166-186	AUGCAUCCUUGGCGGUCU GGUG	208	164-186
AD-960268.1	GCAGGAGUCCCAGGUGG	249	197-217	AGGGCCACCUGGGACUCCUG	250	195-217

	CCCU			CAC		
AD-960269.1	CAGGAGUCCCAGGUGGC CCAU	253	198-218	AUGGGCCACCUGGGACUCCU GCA	254	196-218
AD-960280.1	GGGUGACCGAUGGGCUUC AGUU	223	232-252	AACUGAAGCCAUCGGUCACC CAG	224	230-252
AD-960270.1	AGGAGUCCCAGGUGGCC CAGU	259	199-219	ACUGGGCCACCUGGGACUCC UGC	260	197-219
AD-960273.1	AGUCCCAGGUGGCCAG CAGU	257	202-222	ACUGCUGGGCCACCUGGGAC UCC	258	200-222

Таблица 5. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи агентов дцРНК аполипопротеина С3

Название дуплекса	последовательность смысловой цепи 5'-3'	SEQ ID NO:	последовательность антисмысловой цепи 5'-3'	SEQ ID NO:	Последовательность-мишень мРНК	SEQ ID NO:
AD-960293.1	csusucagUfuCfCfCfugaaagacuL96	341	asAfsugucu(Tgn)ucagggAfaCfugaagscsc	697	GGCUUCAGUUCCCUGAAAGACUA	343
AD-960288.1	ususcaguUfcCfCfUfgaaagacuL96	344	asUfsucag(Ggn)gaacugAfaGfccaucsgsg	698	CCGAUGGCUUCAGUUCCCUGAAA	373
AD-960445.1	cscsaauaAfaGfCfUfggacaagaauL96	347	asCfsacug(Agn)gaauacUfgUfccuususu	699	AAAAGGGACAGUAUUCUCAGUGC	376
AD-960292.1	asasaaggGfaCfAfGfuauucucaguL96	350	asGfsucuu(Tgn)cagggAfcUfgaagcscsa	700	UGGCUUCAGUUCCCUGAAAGACU	370
AD-960475.1	asusggcuUfcAfGfUfuccugaaauL96	353	asUfsucuu(Ggn)uccagcUfuUfaauuggsgsa	701	UCCCAAUAAAGCUGGACAA GAAG	349
AD-	asgscaccGfuUfAfAfggacaag	356	asUfsgaga(Agn)uacuguCfCfuc	702	CUUAAAAGGGACAGUAUUC	361

960442.1	uuuL96		uuuasasg		UCAG	
AD- 960470.1	usasaagGfgAfCfAfguauucu cauL96	359	asGfsucca(Ggn)cuuuauUfgGfg aggcscsa	703	UGGCCUCCCAAUAAAGCUG GACA	450
AD- 960436.1	ascscgauGfgCfUfUfcaguucc cuuL96	362	asUfsacug(Tgn)ccuuuUfaAfg caacscsu	704	AGGUUGC U UAAAAGGGACA GUAU	705
AD- 960446.1	ususaGfgGfAfCfaguauuc ucuL96	365	asGfscacu(Ggn)agaauaCfuGfu cccususu	706	AAAGGGACAGUAUUCUCAG UGCU	435
AD- 960474.1	gscsuucaGfuUfCfCfcgaaag acuL96	368	asUfscuug(Tgn)ccagcuUfuAfu ugggsasg	707	CUCCCAAUAAAGCUGGACA AGAA	396
AD- 960294.1	gsasuggcUfuCfAfGfuuccug aauL96	371	asUfsaguc(Tgn)uucaggGfaAfc ugaasgsc	708	GCUUCAGUUCCUGAAAGA CUAC	346
AD- 960471.1	asasgggaCfaGfUfAfuucucag uguL96	374	asUfsgucc(Agn)gcuuuuUfuGf ggaggsesc	709	GGCCUCCCAAUAAAGCUGG ACAA	388
AD- 960314.1	csusuAfgGfGfAfcaguauu cuuL96	377	asUfsgucc(Tgn)uaacggUfgCfu ccagsusa	710	UACUGGAGCACCGUUAAGG ACAA	399
AD- 960443.1	csuscccaAfuAfAfAfgcuggac aauL96	380	asCfsugag(Agn)auacugUfcCfc uuuusasa	711	UAAAAGGGACAGUAUUCU CAGU	352
AD- 960282.1	usgscuuAfaAfGfGfgacagua uuuL96	383	asGfsaacu(Ggn)aagccaUfcGfg ucaescsc	712	GGGUGACCGAUGGCUUCAG UUC	405
AD- 960283.1	cscsuccAfaUfAfAfcugga cauL96	386	asGfsgaac(Tgn)gaagccAfuCfg gucascsc	713	GGUGACCGAUGGCUUCAGU UCCC	423
AD-	gscsuuaAfaGfGfGfacaguau	389	usAfsгааUfaCfUfguccCfuUfu	392	UAGAAUACUGUCCCUUUUA	714

80794.7	ucuL96		uaagscsa		AGCA	
AD-960295.1	csusucagUfuCfCfCfugaaagacuL96	341	asGfsuagu(Cgn)uuucagGfgAfacugasasg	715	CUUCAGUUCCCUGAAAGACUACU	414
AD-960478.1	gsasuggcUfuCfAfGfuucccugaaL96	371	asAfsgcuu(Cgn)uuguccAfgCfuuuaususg	716	CAAUAAAGCUGGACAAGAA GCUG	441
AD-960289.1	asasgggaCfaGfUfAfuucucaguguL96	374	asUfsuua(Cgn)ggaacuGfaAfgccauscsg	717	CGAUGGCUUCAGUUCCCUGAAAG	355
AD-960481.1	gscsuucaGfuUfCfCfcugaaagacuL96	368	asAfsgcag(Cgn)uucuugUfCfagcuususa	718	UAAAGCUGGACAAGAAGCUGCUA	456
AD-960318.1	cscsaauaAfaGfCfUfggacaagaauL96	347	asAfsacuu(Ggn)uccuuaAfcGfgugcuscsc	719	GGAGCACCGUUAAGGACAA GUUC	358
AD-960297.1	usasaagGfgAfCfAfguauucucuL96	359	asCfsagua(Ggn)ucuuucAfgGfgaacusgsa	720	UCAGUUCCCUGAAAGACUACUGG	453
AD-960477.1	gscscuccCfaAfUfAfaagcuggacuL96	448	asGfscuuc(Tgn)uguccaGfcUfuuaausgsg	721	CCAAUAAAGCUGGACAAGAAGCU	465
AD-960317.1	gsusugcuUfaAfAfAfgggacaguauL96	722	asAfsuug(Tgn)ccuuaaCfgGfugcuscscsa	723	UGGAGCACCGUUAAGGACAAGUU	724
AD-960476.1	asgsggacAfgUfAfUfucucagugcuL96	433	asCfsuucu(Tgn)guccagCfuUfuaugsgsg	725	CCCAAUAAAGCUGGACAAGAAAGC	429
AD-960241.1	cscscaauAfaAfGfCfuggacaagauL96	394	asUfscagu(Ggn)cauccuUfgGfcggucsusu	726	AAGACCGCCAAGGAUGCACUGAG	507
AD-	ususcaguUfcCfCfUfgaaagac	344	asGfscagc(Tgn)ucuuguCfcAfg	727	AUAAAGCUGGACAAGAAGC	483

960480.1	uauL96		cuuusasu		UGCU	
AD- 960482.1	cscsuccAfaUfAfAfacugga cauL96	386	asUfsagca(Ggn)cuucuuGfuCfc agcususu	728	AAAGCUGGACAAGAAGCUG CUAU	498
AD- 80793.7	csusggagCfaCfCfGfuuaagga cauL96	397	usAfsuagCfaGfCfuucuUfgUfc cagcsusu	458	UAUAGCAGCUUCUUGUCCA GCUU	729
AD- 960107.1	asasaaggGfaCfAfGfuauucuc aguL96	350	asCfsugcc(Tgn)cuaggAfuGfa acugsasg	730	CUCAGUUCAUCCCUAGAGG CAGC	570
AD- 960308.1	gsusgaccGfaUfGfGfcuucagu ucuL96	403	asUfsaacg(Ggn)ugcuccAfgUfa gucususu	731	AAAGACUACUGGAGCACCG UUA	417
AD- 960121.1	usgsaccgAfuGfGfCfuucaguu ccuL96	421	asUfsguuc(Cgn)uggagcAfgCfu gccuscsu	732	AGAGGCAGCUGCUCCAGGA ACAG	537
AD- 960287.1	csusuaaaAfgGfGfAfcaguauu cuaL96	17	asUfscagg(Ggn)aacugaAfgCfc aucgsgsu	733	ACCGAUGGCUUCAGUUCCC UGAA	432
AD- 960473.1	uscsaguuCfcCfUfGfaagacu acuL96	412	asCfsuugu(Cgn)cagcuUfaUfu gggasgsg	734	CCUCCCAAUAAAGCUGGAC AAGA	408
AD- 960479.1	asusaaagCfuGfGfAfaagaag cuuL96	439	asCfsagcu(Tgn)cuugucCfaGfc uuuasusu	735	AAUAAAGCUGGACAAGAAG CUGC	510
AD- 960278.1	asusggcuUfcAfGfUfuccuga aauL96	353	asUfsgaag(Cgn)caucggUfcAfc ccagscsc	736	GGCUGGGUGACCGAUGGCU UCAG	426
AD- 960113.1	asasgcugGfaCfAfAfgaagcug cuuL96	454	asGfsagca(Ggn)cugccuCfuAfg ggausgsa	737	UCAUCCCUAGAGGCAGCUG CUCC	555
AD- 960113.1	asgscaccGfuUfAfAfggacaag	356	asUfsuguc(Cgn)agcuuuAfuUf	738	GCCUCCCAAUAAAGCUGGA	382

960472.1	uuuL96		gggagsgsc		CAAG	
AD- 960444.1	asgsuuccCfuGfAfAfagacuac uguL96	451	asAfsauga(Ggn)aaucGfuCfc cuuususa	739	UAAAAGGGACAGUAUUCUC AGUG	402
AD- 960303.1	asasuaaaGfcUfGfGfacaagaa gcuL96	463	asGfsugcu(Cgn)caguagUfcUfu ucagsgsg	740	CCCUGAAAGACUACUGGAG CACC	438
AD- 960438.1	gsasgcacCfgUfUfAfaggacaa guuL96	741	asAfsauac(Tgn)guccuUfuUfa agcasasc	742	GUUGCUIAAAAGGGACAGU AUUC	385
AD- 960290.1	csasauaaAfgCfUfGfgacaaga aguL96	427	asCfsuuuc(Agn)gggaacUfgAfa gccasusc	743	GAUGGCUUCAGUCCCUGA AAGA	447
AD- 960304.1	gsasccgcCfaAfGfGfaugcacu gauL96	505	asGfsgugc(Tgn)ccaguaGfuCfu uucasgsg	744	CCUGAAAGACUACUGGAGC ACCG	558
AD- 960388.1	asasagcuGfgAfCfAfagaagcu gcuL96	481	asGfsguau(Tgn)gaggucUfcAfg gcagscsc	745	GGCUGCCUGAGACCUCAAU ACCC	480
AD- 960233.1	asgscuggAfcAfAfGfaagcugc uauL96	496	asUfscuu(Ggn)gcggucUfuGf guggcsgsu	746	ACGCCACCAAGACCGCCAA GGAU	600
AD- 960234.1	gscsuggaCfaAfGfAfagcugcu auaL96	457	asAfsuccu(Tgn)ggcggucUfuUfg guggscsg	747	CGCCACCAAGACCGCCAAG GAUG	420
AD- 960114.1	csasguucAfuCfCfCfuagaggc aguL96	568	asGfsgagc(Agn)gcugccUfcUfa gggasusg	748	CAUCCCUAGAGGCAGCUGC UCCA	519
AD- 960296.1	asgsacuaCfuGfGfAfgcaccgu uauL96	415	asAfsuag(Tgn)cuuucGfgGfa acugsasa	749	UUCAGUCCCUGAAAGACU ACUG	471
AD-	asgsgcagCfuGfCfUfccaggaa	535	asUfscuu(Tgn)uuagcAfaCfc	750	CCUGUAGGUUGCUIAAAAG	531

960431.1	cauL96		uacasgsg		GGAC	
AD-960316.1	csgsauggCfuUfCfAfguuccu gauL96	430	asCfsuugu(Cgn)cuuaacGfgUfg cuccsasg	751	CUGGAGCACCGUUAAGGAC AAGU	588
AD-960307.1	uscscAAUfaAfAfGfcuggaca aguL96	406	asAfsacgg(Tgn)gcuccaGfuAfg ucuususc	752	GAAAGACUACUGGAGCACC GUUA	444
AD-960120.1	usasaagcUfgGfAfCfaagaagc uguL96	508	asGfsuucc(Tgn)ggagcaGfcUfg ccucsusa	753	UAGAGGCAGCUGCUCCAGG AACA	579
AD-960238.1	csusggguGfaCfCfGfauggcuu cauL96	424	asGfsugca(Tgn)ccuuggCfGfu cuugsgsu	754	ACCAAGACCGCCAAGGAUG CACU	755
AD-960301.1	asusccuAfgAfGfGfcagcugc ucuL96	553	asGfscucc(Agn)guagucUfuUfc agggsasa	756	UUCCCUGAAAGACUACUGG AGCA	462
AD-960235.1	csuscccaAfuAfAfAfgcuggac aauL96	380	asCfsaucc(Tgn)uggcggUfcUfu ggugsgsc	757	GCCACCAAGACCGCCAAGG AUGC	492
AD-960123.1	asasagggAfcAfGfUfauucua guuL96	400	asUfscugu(Tgn)ccuggaGfcAfg cugcscsu	758	AGGCAGCUGCUCCAGGAAC AGAG	540
AD-960300.1	csusgaaaGfaCfUfAfcuggagc acuL96	436	asCfsucca(Ggn)uagucuUfuCfa gggasasc	759	GUUCCCUGAAAGACUACUG GAGC	513
AD-960285.1	usgscuuAfaAfGfGfgacagua uuuL96	383	asAfsggga(Agn)cugaagCfcAfu cgguscsa	760	UGACCGAUGGCUUCAGUUC CCUG	364
AD-960469.1	usgsgcuuCfaGfUfUfccugaa aguL96	445	asUfscag(Cgn)uuuauuGfgGfa ggccsasg	761	CUGGCCUCCAAUAAAGCU GGAC	567
AD-	usgsaaagAfcUfAfCfuggagca	556	asGfsuauu(Ggn)aggucuCfaGfg	762	UGGCUGCCUGAGACCUCAA	564

960387.1	ccuL96		cagcscsa		UACC	
AD-960384.1	csusgccuGfaGfAfcfcucaaua ccuL96	478	asUfsugag(Ggn)ucucagGfcAfg ccacsgsg	763	CCGUGGCUGCCUGAGACCU CAAU	582
AD-960109.1	gscscaccAfaGfAfcfcgccaag gauL96	598	asAfsgcug(Cgn)cucuagGfgAfu gaacsusg	764	CAGUUCAUCCCUAGAGGCA GCUG	645
AD-960112.1	cscsaccaAfgAfcfcgccaagg auuL96	418	asAfsgcag(Cgn)ugccucUfaGfg gaugsasa	765	UUCAUCCCUAGAGGCAGCU GCUC	477
AD-960386.1	uscscuaGfaGfGfcfagcugcu ccuL96	517	asUfsauug(Agn)ggucucAfgGf cagccsasc	766	GUGGCUGCCUGAGACCUCA AUAC	573
AD-960302.1	csasguucCfcUfGfAfaagacia cuuL96	469	asUfsgcuc(Cgn)aguaguCfuUfu caggsgsa	767	UCCCUGAAAGACUACUGGA GCAC	474
AD-960118.1	usgsuaggUfuGfCfUfuaaaagg gauL96	529	asUfscug(Ggn)agcagcUfgCfc ucuasgsg	768	CCUAGAGGCAGCUGCUCCA GGAA	639
AD-960111.1	gsgsagcaCfcGfUfUfaaggaca aguL96	586	asGfscagc(Tgn)gccucuAfgGfg augasasc	769	GUUCAUCCCUAGAGGCAGC UGCU	606
AD-960299.1	asasgacuAfcUfGfGfagcaccg uuuL96	442	asUfscag(Tgn)agucuuUfcAfg ggaascsu	770	AGUUCCCUGAAAGACUACU GGAG	486
AD-960115.1	gsasggcaGfcUfGfcfuccagga acuL96	577	asUfsggag(Cgn)agcugcCfuCfu agggsasu	771	AUCCCUAGAGGCAGCUGCU CCAG	501
AD-960439.1	csasagacCfcCfAfaggaugc acuL96	772	asGfsaaua(Cgn)uguccUfuUfu aagcsasa	773	UUGCUUAAAAGGGACAGUA UUCU	391
AD-	cscscugaAfaGfAfcfuacugga	460	asGfsagaa(Tgn)acugucCfcUfu	774	GCUUAAAAGGGACAGUAU	367

960441.1	gcuL96		uuaasgsc		CUCA	
AD-960232.1	csasccaaGfaCfCfGfccaagga uguL96	490	asCfscuug(Ggn)cggucuUfgGf uggcgsusg	775	CACGCCACCAAGACCGCCA AGGA	543
AD-960276.1	gscsagcuGfcUfCfCfaggaaca gauL96	538	asAfsagcc(Agn)ucggucAfcCfc agccscsc	776	GGGGCUGGGUGACCGAUGG CUUC	468
AD-960435.1	uscscugAfaAfGfAfcuacugg aguL96	511	asAfscugu(Cgn)ccuuuuAfaGfc aaccsusa	777	UAGGUUGCUUAAAAGGGAC AGUA	411
AD-960306.1	ascscgauGfgCfUfUfcaguucc cuuL96	362	asAfscggu(Ggn)cuccagUfaGfu cuuuscsa	778	UGAAAGACUACUGGAGCAC CGUU	534
AD-960172.1	gsgscucCfcAfAfUfaaagcug gauL96	565	asCfscucg(Ggn)ccucugAfaGfc ucggsgsc	779	GCCCGAGCUUCAGAGGCCG AGGA	633
AD-960385.1	gscsugccUfgAfGfAfccucaa acuL96	562	asAfsuuga(Ggn)gucucaGfgCfa gccascsg	780	CGUGGCUGCCUGAGACCUC AAUA	549
AD-960110.1	gsusggcuGfcCfUfGfagaccuc aauL96	580	asCfsagcu(Ggn)ccucuaGfgGfa ugaascsu	781	AGUUCAUCCCUAGAGGCAG CUGC	609
AD-960116.1	gsusucauCfcCfUfAfgaggcag cuuL96	643	asCfsugga(Ggn)cagcugCfcUfc uaggsgsa	782	UCCCUAGAGGCAGCUGCUC CAGG	528
AD-960434.1	csasucccUfaGfAfGfgcagcug cuuL96	475	asCfsuguc(Cgn)cuuuuaAfgCfa accusasc	783	GUAGGUUGCUUAAAAGGGA CAGU	495
AD-960430.1	gsgscugcCfuGfAfGfaccucaa uauL96	571	asCfscuu(Tgn)uaagcaAfcCfu acagsgsg	784	CCCUGUAGGUUGCUUAAA GGGA	591
AD-	cscsugaaAfgAfCfUfacuggag	472	asCfsggug(Cgn)uccaguAfgUfc	785	CUGAAAGACUACUGGAGCA	576

960305.1	cauL96		uuucsasg		CCGU	
AD-960279.1	usasgaggCfaGfCfUfgcuccag gauL96	637	asCfsugaa(Ggn)ccaucgGfuCfa cccasgsc	786	GCUGGGUGACCGAUGGCUU CAGU	630
AD-960298.1	uscsauccCfuAfGfAfggcagcu gcuL96	604	asCfscagu(Agn)gucuuuCfaGfg gaacsusg	787	CAGUUCCCUGAAAGACUAC UGGA	594
AD-960284.1	ususccuGfaAfAfGfacuacug gauL96	484	asGfsggaa(Cgn)ugaagcCfaUfc ggucsasc	788	GUGACCGAUGGCUUCAGUU CCCU	516
AD-960313.1	cscscuagAfgGfCfAfgcugcuc cauL96	499	asGfsuccu(Tgn)aacgguGfcUfc cagusasg	789	CUACUGGAGCACCGUUAAG GACA	627
AD-960432.1	gscsuuaaAfaGfGfGfacaguau ucuL96	389	asGfsucc(Tgn)uuuaagCfaAfc cuacsasg	790	CUGUAGGUUGCUUAAAAGG GACA	525
AD-960124.1	ususaaaaGfgGfAfCfaguauuc ucuL96	365	asCfsucug(Tgn)uccuggAfgCfa gcugsesc	791	GGCAGCUGCUCCAGGAACA GAGG	651
AD-960119.1	csgsccacCfaAfGfAfccgcaa gguL96	541	asUfsuccu(Ggn)gagcagCfuGfc cucusasg	792	CUAGAGGCAGCUGCUCCAG GAAC	603
AD-960437.1	gsgscuggGfuGfAfCfcgaugg cuuuL96	466	asAfsuacu(Ggn)uccuuUfuAfa gcaascsc	793	GGUUGCUUAAAAGGGACAG UAUU	794
AD-960315.1	gsgsuugcUfuAfAfAfgggac aguL96	409	asUfsuguc(Cgn)uuaacgGfuGfc uccasgsu	795	ACUGGAGCACCGUUAAGGA CAAG	504
AD-960117.1	asasagacUfaCfUfGfgagcacc guuL96	532	asCfscugg(Agn)gcagcuGfcCfu cuagsgsg	796	CCCUAGAGGCAGCUGCUCC AGGA	657
AD-	cscsgagcUfuCfAfGfaggccga	631	asCfscuua(Agn)cggugcUfcCfa	797	GACUACUGGAGCACCGUUA	546

960311.1	gguL96		guagsusc		AGGA	
AD-960272.1	usgsgcugCfcUfGfAfgaccuca auuL96	547	asUfsgcug(Ggn)gccaccUfgGfg acucscsu	798	AGGAGUCCCAGGUGGCCCA GCAG	660
AD-960414.1	ususcaucCfcUfAfGfaggcagc uguL96	607	asUfsgcag(Ggn)acccaaGfgAfg cucgscsa	799	UGCGAGCUCCUUGGGUCCU GCAA	612
AD-960240.1	cscsuagaGfgCfAfGfcugcucc aguL96	526	asCfsagug(Cgn)auccuuGfgCfg gucususg	800	CAAGACCGCCAAGGAUGCA CUGA	663
AD-960286.1	asgsguugCfuUfAfAfaaggac aguL96	493	asCfsaggg(Agn)acugaaGfcCfa ucggsusc	801	GACCGAUGGCUUCAGUCC CUGA	522
AD-960281.1	csusguagGfuUfGfCfuuaaaag gguL96	589	asAfsacug(Agn)agccauCfgGfu caccscsa	802	UGGGUGACCGAUGGCUUCA GUUC	672
AD-960277.1	gsasaagaCfuAfCfUfggagcac cguL96	574	asGfsaagc(Cgn)aucgguCfaCfc cagcscsc	803	GGGCUGGGUGACCGAUGGC UUCA	585
AD-960274.1	usgsggugAfcCfGfAfuggcuu caguL96	628	asUfsggcc(Tgn)gcugggCfcAfc cuggsgsa	804	UCCCAGGUGGCCCAGCAGG CCAG	666
AD-960108.1	gsusucccUfgAfAfAfgacuacu gguL96	592	asGfscugc(Cgn)ucuaggGfaUfg aacusgsa	805	UCAGUUCAUCCCUAGAGGC AGCU	624
AD-960239.1	gsasccgaUfgGfCfUfucaguuc ccuL96	514	asAfsugug(Agn)uccuugGfcGf gucuusgsg	806	CCAAGACCGCCAAGGAUGC ACUG	561
AD-960122.1	ascsuggaGfcAfCfCfguuaagg acuL96	625	asCfsuguu(Cgn)cuggagCfaGfc ugccsusc	807	GAGGCAGCUGCUCAGGAA CAGA	615
AD-	gsusagguUfgCfUfUfaaaagg	523	asUfscuuu(Cgn)agggaaCfuGfa	808	AUGGCUUCAGUUCCUGAA	552

960291.1	acuL96		agccsasu		AGAC	
AD-960125.1	csasgcugCfuCfCfAfggaacag aguL96	649	asCfscucu(Ggn)uuccugGfaGfc agcusgsc	809	GCAGCUGCUCCAGGAACAG AGGU	690
AD-960231.1	asgsaggcAfgCfUfGfcuccagg aauL96	601	asCfsuugg(Cgn)ggucuuGfgUf ggcgusgsc	810	GCACGCCACCAAGACCGCC AAGG	669
AD-960275.1	ususgcuuAfaAfAfGfggacag uauuL96	811	asAfsGCCa(Tgn)cggucaCfcCfa gccccsu	812	AGGGGCUGGGUGACCGAUG GCUU	597
AD-960173.1	usgsgagcAfcCfGfUfuaaggac aauL96	502	asUfscuc(Ggn)gccucuGfaAfg cucgsgsg	813	CCCGAGCUUCAGAGGCCGA GGAU	654
AD-960271.1	csusagagGfcAfGfCfugcuca gguL96	655	asGfscugg(Ggn)ccaccuGfgGfa cuccsusg	814	CAGGAGUCCCAGGUGGCC AGCA	678
AD-960433.1	csusacugGfaGfCfAfccguuaa gguL96	544	asUfsgucc(Cgn)uuuuuaGfcAfa ccuascsa	815	UGUAGGUUGCuuAAAAGGG ACAG	489
AD-960267.1	gsasguccCfaGfGfUfggcccag cauL96	658	asGfsgcca(Cgn)cugggaCfuCfc ugcascsg	816	CGUGCAGGAGUCCCAGGUG GCCC	684
AD-960236.1	csgsagcuCfcUfUfGfgguccug cauL96	610	asGfscauc(Cgn)uuggcgGfuCfu uggusgsg	817	CCACCAAGACCGCCAAGGA UGCA	636
AD-960310.1	asgsaccgCfcAfAfGfgaugcac uguL96	661	asCfsuuua(Cgn)ggugcuCfcAfg uaguscsu	818	AGACUACUGGAGCACCGUU AAGG	648
AD-960312.1	cscsgaugGfcUfUfCfaguuccc uguL96	520	asUfscuu(Agn)acggugCfuCfc aguasgsu	819	ACUACUGGAGCACCGUUA GGAC	675
AD-	gsgsugacCfgAfUfGfgcuucag	670	asUfsuaac(Ggn)gugcucCfaGfu	820	AAGACUACUGGAGCACCGU	621

960309.1	uuuL96		agucsusu		UAAG	
AD- 960440.1	gscsugggUfgAfCfCfgauggc uucuL96	583	asAfsgaau(Agn)cuguccCfuUfu uaagscsa	821	UGC U U A A A A G G G A C A G U A U UCUC	379
AD- 960237.1	cscsagguGfgCfCfCfagcaggc cauL96	664	asUfsgcau(Cgn)cuuggcGfgUfc uuggsusg	822	CACCAAGACCGCCAAGGAU GCAC	618
AD- 960268.1	asgsuucUfcCfCfUfagaggca gcuL96	622	asGfsggcc(Agn)ccugggAfcUfc cugcsasc	823	GUGCAGGAGUCCCAGGUGG CCCA	681
AD- 960269.1	asasgaccGfcCfAfAfggaugca cuuL96	559	asUfsgggc(Cgn)accuggGfaCfu ccugscsa	824	UGCAGGAGUCCCAGGUGGC CCAG	687
AD- 960280.1	gsgscagcUfgCfUfCfcaggaac aguL96	613	asAfscuga(Agn)gccaucGfgUfc accsasg	825	CUGGGUGACCGAUGGCUUC AGUU	642
AD- 960270.1	gsgscuucAfgUfUfCfcugaaa gauL96	550	asCfsuggg(Cgn)caccugGfgAfc uccusgsc	826	GCAGGAGUCCCAGGUGGCC CAGC	696
AD- 960273.1	asgscugcUfcCfAfGfgaacaga gguL96	688	asCfsugcu(Ggn)ggccacCfuGfg gacuscsc	827	GGAGUCCCAGGUGGCCAG CAGG	693

Таблица 6. Скрининг для АРОСЗ с однократной дозой в клетках Нер3В

Дуплекс	50 нМ доза		10 нМ доза		1,0 нМ доза		0,1 нМ доза	
	Средний % оставшейся мРНК АРОСЗ	SD	Средний % оставшейся мРНК АРОСЗ	SD	Средний % оставшейся мРНК АРОСЗ	SD	Средний % оставшейся мРНК АРОСЗ	SD
AD-959917.1	4,2	1,8	5,1	1,6	17,7	3,8	53,5	5,1
AD-959918.1	5,1	0,8	5,6	2,2	34,5	13,4	52,1	10,0
AD-960096.1	7,8	4,6	7,3	2,2	24,3	2,1	88,2	6,8
AD-960064.1	3,7	0,4	8,2	1,0	22,1	6,2	40,1	7,3
AD-959914.1	5,9	1,1	9,8	2,4	39,4	4,2	70,4	17,8
AD-959941.1	11,5	6,1	9,9	1,7	33,7	2,9	75,4	4,8
AD-960031.1	6,5	2,2	9,9	3,0	18,8	3,4	47,6	2,7
AD-959910.1	5,5	0,9	10,5	1,6	28,4	7,3	60,4	5,8
AD-960063.1	8,5	3,1	11,1	2,4	29,7	7,1	79,4	10,0
AD-67781.7	6,1	1,5	11,2	2,5	45,7	2,2	61,4	3,7
AD-67782.2	6,3	1,0	12,4	5,6	38,0	2,3	68,4	8,5
AD-959916.1	5,3	0,7	12,5	2,8	45,6	5,9	58,5	2,0
AD-959913.1	6,2	0,3	12,7	1,1	32,2	5,9	67,0	10,0
AD-960066.1	7,7	1,1	13,2	1,6	42,3	3,7	94,7	27,8
AD-960062.1	8,8	1,2	13,7	1,8	48,8	4,7	73,1	16,8
AD-960093.1	12,5	1,8	13,7	3,0	37,4	12,5	64,0	17,2
AD-960061.1	7,3	0,4	13,9	1,3	42,4	7,9	69,2	10,6
AD-960092.1	16,2	10,7	14,2	2,0	53,1	13,9	95,0	13,2
AD-960030.1	14,8	5,6	14,7	1,2	40,7	8,2	94,2	9,5
AD-80794.6	15,2	6,5	15,5	1,7	41,3	5,3	84,6	1,8
AD-960095.1	12,6	1,6	16,0	1,9	55,4	9,0	86,4	2,9
AD-959938.1	14,9	8,3	16,5	3,4	59,9	12,6	83,8	4,5
AD-960065.1	12,6	3,5	17,1	3,8	51,7	7,4	79,1	10,3
AD-959907.1	10,7	5,0	17,4	6,4	51,1	3,5	89,4	10,9
AD-960094.1	12,4	3,7	18,8	5,3	76,5	17,2	131,2	4,0
AD-960060.1	12,9	2,6	19,3	3,7	77,8	5,5	69,6	5,8
AD-959919.1	14,1	3,1	19,8	2,0	72,6	13,4	105,9	9,6

AD-959932.1	11,8	5,9	20,1	8,9	47,1	9,8	102,2	4,3
AD-959859.1	20,6	8,2	20,5	6,8	93,5	12,1	161,4	40,6
AD-959908.1	9,6	2,2	20,8	2,5	48,7	4,7	78,8	18,0
AD-959903.1	12,9	5,5	20,9	3,1	58,0	14,2	96,2	12,5
AD-960097.1	19,1	6,5	21,0	4,9	77,5	11,3	78,4	3,8
AD-959912.1	12,0	1,3	21,1	1,3	75,3	10,6	108,4	26,5
AD-960067.1	19,9	4,6	21,2	3,6	81,4	11,3	85,8	9,3
AD-959927.1	16,1	2,6	21,3	6,3	68,8	13,0	102,7	17,7
AD-960099.1	13,4	3,0	21,9	3,6	46,1	8,7	76,3	4,2
AD-959931.1	20,4	5,4	22,6	7,6	58,7	5,0	105,7	12,0
AD-959879.1	12,6	5,1	22,8	6,0	89,8	10,4	78,1	2,3
AD-960091.1	29,8	7,8	23,2	6,8	84,3	16,5	159,8	73,0
AD-959921.1	14,9	5,1	23,2	6,6	64,2	8,3	71,0	7,7
AD-960102.1	19,2	3,9	23,3	10,3	43,4	10,5	75,9	13,5
AD-80793.6	21,8	3,6	24,3	3,9	51,8	12,8	90,4	7,2
AD-959925.1	13,0	1,5	25,2	3,3	75,6	10,3	87,4	21,4
AD-960098.1	31,3	4,6	26,8	6,1	103,2	15,8	93,3	4,5
AD-959901.1	23,6	8,4	27,1	6,8	97,7	8,5	162,1	29,0
AD-959920.1	21,7	0,4	28,1	4,4	83,1	11,3	101,1	20,9
AD-959926.1	21,6	6,1	29,3	8,9	98,8	21,6	113,8	18,8
AD-959737.1	33,0	9,7	30,3	7,5	78,6	12,9	95,6	8,4
AD-960011.1	14,5	4,9	33,2	5,1	104,7	19,0	101,2	12,7
AD-960101.1	24,7	4,0	33,2	10,2	82,8	7,0	159,8	73,4
AD-959923.1	14,1	3,3	33,2	2,8	74,7	12,0	78,8	4,9
AD-68107.2	21,1	5,4	33,3	5,5	67,1	11,7	113,1	10,0
AD-960058.1	35,5	4,4	33,7	6,2	98,2	19,6	138,9	18,2
AD-68103.2	27,9	6,5	34,1	11,0	69,9	2,5	105,4	14,6
AD-959860.1	27,6	6,2	35,5	11,2	98,2	16,5	164,2	15,9
AD-960059.1	17,1	2,1	38,7	5,3	131,1	18,8	119,6	59,9
AD-960103.1	40,3	3,0	39,4	5,8	69,9	4,1	95,8	2,3
AD-959740.1	37,2	4,1	39,5	5,8	97,8	27,9	96,4	7,4
AD-959939.1	31,1	2,2	40,4	6,6	94,9	12,6	104,9	21,0
AD-959865.1	35,7	8,5	41,0	2,8	92,9	11,8	111,2	7,3
AD-960100.1	31,6	3,3	43,2	10,9	75,7	11,1	103,8	17,7

AD-959924.1	21,9	4,3	43,2	8,2	102,8	20,3	96,8	10,7
AD-959909.1	24,2	3,5	45,1	3,1	92,8	7,8	79,7	3,7
AD-959739.1	38,8	2,4	46,4	7,9	101,5	5,6	108,4	4,3
AD-959911.1	21,5	3,8	46,9	9,1	90,4	13,1	104,5	9,5
AD-960057.1	32,9	2,5	47,8	3,1	95,1	7,8	79,8	12,9
AD-959741.1	42,5	1,7	48,5	6,4	89,5	14,3	117,1	10,4
AD-960056.1	24,9	0,9	48,6	6,1	87,6	15,6	85,7	6,9
AD-959930.1	52,4	8,4	49,4	9,3	86,6	17,9	118,5	15,0
AD-959746.1	41,4	5,4	49,6	2,4	62,0	7,8	111,9	15,6
AD-959748.1	40,9	5,9	50,1	15,5	89,4	14,7	100,3	10,6
AD-959857.1	41,9	19,2	51,7	3,9	106,7	11,7	105,0	14,0
AD-959935.1	35,3	2,3	54,1	13,2	126,1	24,7	188,1	72,0
AD-960008.1	56,3	9,9	54,4	5,8	92,2	7,7	109,6	19,1
AD-959915.1	30,3	5,8	57,3	3,7	104,2	15,9	82,1	7,3
AD-959738.1	52,6	10,0	58,6	9,4	94,3	14,0	100,5	22,3
AD-959928.1	42,3	6,1	60,0	7,6	85,3	11,8	123,3	14,2
AD-959863.1	58,7	4,0	60,1	9,5	81,4	4,9	119,4	8,8
AD-960010.1	58,6	8,9	60,3	11,8	115,5	18,5	105,5	13,5
AD-960090.1	73,2	10,7	60,5	16,0	102,0	14,8	95,3	11,5
AD-959732.1	45,4	6,7	63,0	6,1	101,4	14,6	118,0	11,4
AD-960009.1	50,6	5,9	63,1	17,5	106,1	10,9	109,4	19,6
AD-959929.1	72,2	10,3	66,2	15,5	140,7	47,3	108,3	18,1
AD-959745.1	48,8	7,7	66,8	15,0	104,7	17,4	125,3	7,3
AD-960007.1	64,1	8,4	67,0	13,1	86,3	8,9	104,1	7,6
AD-959902.1	41,4	9,8	68,2	4,7	98,8	18,0	132,1	37,4
AD-959940.1	50,8	9,8	69,0	9,1	105,0	18,3	96,8	13,0
AD-960055.1	52,7	8,5	70,1	5,7	101,4	20,6	115,3	18,2
AD-959922.1	54,7	6,2	70,1	6,4	113,6	16,0	93,0	7,3
AD-959900.1	65,2	7,0	70,6	5,3	102,9	11,3	179,9	77,2
AD-959858.1	72,9	18,5	71,4	17,7	103,4	11,1	116,6	6,1
AD-959744.1	56,0	11,2	71,6	22,1	106,2	18,3	127,0	21,8
AD-959736.1	67,3	8,2	72,6	10,6	100,5	15,8	108,3	15,6
AD-959735.1	68,8	14,9	75,5	15,3	112,0	26,5	116,0	19,0
AD-960039.1	94,8	13,8	75,5	15,3	112,7	8,6	138,0	14,7

AD-959747.1	75,4	8,4	76,0	10,3	121,7	13,3	100,0	5,8
AD-959862.1	79,3	3,4	77,9	25,8	103,2	7,9	118,8	12,4
AD-959933.1	66,7	12,1	79,0	10,7	121,8	16,7	142,3	29,2
AD-959733.1	60,8	10,8	81,7	15,8	95,7	15,4	114,2	9,7
AD-959937.1	65,7	6,0	85,2	13,6	120,8	17,1	101,8	3,2
AD-959904.1	52,7	7,6	86,9	6,4	130,2	24,2	124,9	16,7
AD-959797.1	85,6	3,9	87,2	16,3	102,0	5,9	129,5	24,1
AD-959861.1	63,0	14,0	88,4	16,5	109,2	7,3	140,1	25,0
AD-959743.1	56,2	4,8	89,3	9,4	100,1	5,8	143,9	25,4
AD-959905.1	55,9	20,6	91,7	11,8	110,6	16,2	122,3	33,1
AD-959734.1	67,0	10,9	93,5	18,4	100,7	19,0	128,9	13,4
AD-959934.1	82,1	17,1	95,1	24,1	109,8	7,7	115,6	12,4
AD-959749.1	74,1	15,9	95,7	13,1	111,2	15,8	129,2	16,1
AD-959798.1	111,9	18,4	96,6	20,7	134,4	42,1	124,5	40,5
AD-959742.1	79,3	6,8	104,1	18,5	117,5	14,2	167,7	48,7
AD-959897.1	114,4	14,2	104,7	20,1	95,8	14,8	103,7	11,1
AD-959864.1	139,0	7,4	108,7	19,7	121,8	8,3	134,4	34,1
AD-959899.1	111,2	12,3	109,0	17,8	99,4	6,6	114,9	19,1
AD-959856.1	120,8	10,0	112,1	6,2	142,0	30,4	86,1	4,2
AD-959906.1	87,2	12,3	112,3	15,7	119,5	3,6	123,0	9,0
AD-959936.1	95,8	11,2	112,6	17,9	108,7	12,1	133,5	20,9
AD-959896.1	86,2	10,8	114,9	9,7	104,9	12,0	111,6	13,5
AD-959893.1	110,4	6,1	115,5	23,1	102,0	14,7	112,9	9,6
AD-959892.1	97,9	20,0	118,4	10,8	97,9	9,2	114,0	14,5
AD-959894.1	118,2	10,8	132,2	25,9	103,5	3,9	134,0	17,1
AD-959750.1	150,2	3,6	136,5	12,9	113,4	7,3	135,5	21,5
AD-959898.1	129,1	11,8	139,1	29,1	125,4	12,1	137,4	13,5
AD-959895.1	107,1	12,9	158,5	27,8	116,8	12,8	133,9	13,1

Таблица 7. Скрининг для АРОСЗ с однократной дозой в клетках Нер3В

Дуплекс	50 нМ доза		10 нМ доза		1,0 нМ доза		0,1 нМ доза	
	Средний % оставшейся мРНК АРОСЗ	SD	Средний % оставшейся мРНК АРОСЗ	SD	Средний % оставшейся мРНК АРОСЗ	SD	Средний % оставшейся мРНК АРОСЗ	SD
AD-960293.1	5,3	1,1	4,4	0,9	12,7	3,6	49,3	8,8
AD-960288.1	7,1	1,1	4,5	0,3	16,4	2,8	60,9	3,2
AD-960445.1	7,2	2,3	4,6	0,9	24,9	4,1	67,0	11,2
AD-960292.1	8,4	2,7	6,1	1,8	35,0	3,6	89,3	13,2
AD-960475.1	9,5	1,8	6,2	1,5	20,0	7,7	79,7	7,4
AD-960442.1	12,1	1,5	6,5	1,7	21,5	1,3	79,3	18,3
AD-960470.1	11,8	1,9	7,1	0,6	40,0	10,6	78,1	5,5
AD-960436.1	11,3	3,2	7,9	2,0	31,6	3,0	86,2	7,7
AD-960446.1	8,3	1,8	8,4	1,6	43,0	10,6	77,2	4,3
AD-960474.1	11,6	1,8	8,4	0,9	39,4	5,9	103,2	18,7
AD-960294.1	14,0	1,7	8,5	1,6	32,8	9,1	74,7	5,8
AD-960471.1	12,2	1,5	8,5	0,8	28,8	7,5	81,1	16,8
AD-960314.1	11,0	0,4	9,3	1,1	41,2	9,8	79,2	4,3
AD-960443.1	17,7	6,1	9,9	2,6	33,4	5,5	95,7	15,2
AD-960282.1	12,2	1,9	10,0	2,4	51,8	13,2	106,4	30,6
AD-960283.1	13,2	0,9	10,0	1,3	50,3	6,3	101,6	8,4
AD-80794.7	9,5	1,4	10,8	2,5	34,9	9,1	78,4	7,5
AD-960295.1	25,0	4,9	11,4	4,0	43,9	2,4	82,2	10,5
AD-960478.1	15,1	1,9	11,8	3,4	17,7	2,1	62,6	9,7
AD-960289.1	14,9	0,7	11,8	1,4	44,7	4,4	97,2	16,6
AD-960481.1	17,1	2,8	12,8	2,3	25,9	6,9	56,2	2,0
AD-960318.1	21,0	5,6	13,3	2,4	43,2	2,3	83,6	11,4
AD-960297.1	21,5	2,5	14,1	1,8	49,0	5,0	103,4	9,0
AD-960477.1	13,6	5,0	14,1	3,1	29,8	6,1	89,6	17,5
AD-960317.1	20,9	5,7	14,3	3,9	48,5	19,9	101,0	28,8
AD-960476.1	14,2	1,5	16,3	1,0	41,1	7,5	92,0	4,5
AD-960241.1	15,6	2,3	17,1	1,4	68,4	8,4	103,7	27,4

AD-960480.1	20,1	1,0	18,0	2,5	62,0	10,9	91,8	12,4
AD-960482.1	25,5	6,0	19,8	2,8	37,2	3,5	60,8	11,6
AD-80793.7	16,6	3,1	20,2	3,5	43,8	5,9	64,1	5,9
AD-960107.1	30,1	1,1	20,6	3,8	61,2	8,7	95,4	14,3
AD-960308.1	31,9	3,3	23,3	2,2	48,0	5,8	90,2	4,9
AD-960121.1	25,3	4,5	24,7	4,5	65,9	7,8	87,0	12,5
AD-960287.1	37,5	6,9	24,8	10,3	90,3	22,4	82,9	5,2
AD-960473.1	22,4	5,3	25,1	3,4	98,0	19,4	104,8	24,8
AD-960479.1	28,3	4,1	25,4	8,2	72,6	18,2	90,5	8,2
AD-960278.1	22,8	5,6	25,6	5,4	71,9	8,8	105,8	15,8
AD-960113.1	26,5	4,8	25,7	7,0	59,0	5,7	114,0	17,3
AD-960472.1	38,2	8,0	26,5	8,2	56,0	8,7	107,3	28,4
AD-960444.1	26,5	4,8	27,3	3,0	72,4	12,5	127,2	16,8
AD-960303.1	30,6	4,3	28,4	6,1	82,0	15,0	104,9	20,2
AD-960438.1	31,3	4,4	28,6	6,0	59,2	6,1	90,3	14,4
AD-960290.1	29,8	5,6	30,3	3,9	80,8	4,3	107,1	12,4
AD-960304.1	32,6	7,7	30,4	3,0	86,3	9,9	100,4	15,6
AD-960388.1	29,6	2,0	30,7	2,2	71,8	11,7	102,8	27,2
AD-960233.1	28,4	4,7	31,5	5,7	96,7	11,8	99,0	17,2
AD-960234.1	46,3	7,2	33,1	8,5	93,3	10,2	97,3	14,5
AD-960114.1	15,9	2,5	33,2	4,3	58,9	4,5	93,9	11,3
AD-960296.1	49,5	5,3	34,5	9,2	70,8	7,0	93,6	8,3
AD-960431.1	40,7	8,8	35,1	1,1	87,2	3,7	108,8	8,6
AD-960316.1	35,5	2,6	37,2	8,2	78,9	14,8	93,4	15,1
AD-960307.1	25,4	1,3	37,4	4,6	90,9	7,7	99,5	10,8
AD-960120.1	21,4	1,7	37,8	5,6	86,5	12,6	107,1	16,1
AD-960238.1	20,5	2,9	37,9	9,9	79,7	22,5	128,8	11,2
AD-960301.1	35,6	6,4	38,2	7,4	75,6	9,0	101,6	21,1
AD-960235.1	32,1	6,1	39,4	12,7	107,9	8,9	167,9	37,6
AD-960123.1	29,3	3,4	42,8	3,8	85,3	7,9	101,2	19,9
AD-960300.1	24,4	3,1	45,3	13,1	77,9	12,3	101,2	15,3
AD-960285.1	64,5	4,8	46,0	6,9	86,7	12,6	98,6	9,4
AD-960469.1	43,0	6,1	46,3	6,8	72,4	12,5	96,4	20,8
AD-960387.1	40,5	2,6	46,6	16,0	94,0	8,6	99,9	6,8

AD-960384.1	42,8	2,9	47,1	2,9	103,6	9,9	103,2	13,1
AD-960109.1	41,1	5,7	48,6	6,8	66,1	7,0	81,6	10,0
AD-960112.1	44,6	2,4	48,8	5,3	69,0	17,5	103,7	12,3
AD-960386.1	59,3	4,9	49,2	10,1	100,5	20,4	106,1	13,2
AD-960302.1	69,2	12,5	49,4	10,1	82,4	14,5	106,2	14,6
AD-960118.1	44,1	5,1	49,7	10,8	98,1	23,5	136,2	29,0
AD-960111.1	43,3	6,9	50,0	4,5	93,6	9,3	107,0	20,0
AD-960299.1	44,7	5,2	51,2	4,0	105,0	11,8	114,8	7,7
AD-960115.1	42,3	6,0	52,1	2,6	82,4	12,1	85,4	15,0
AD-960439.1	51,3	16,3	52,8	1,8	92,2	13,9	98,5	12,5
AD-960441.1	74,3	9,3	53,2	5,7	98,1	21,9	102,2	20,2
AD-960232.1	43,3	6,8	54,7	4,6	105,5	8,5	109,6	5,2
AD-960276.1	39,7	10,0	54,9	21,4	101,5	29,8	107,1	22,3
AD-960435.1	64,2	1,1	57,2	4,9	85,5	12,3	109,9	13,3
AD-960306.1	57,8	4,6	57,8	3,7	74,1	15,0	91,4	10,5
AD-960172.1	39,5	1,4	57,8	3,6	117,6	27,7	115,2	36,2
AD-960385.1	89,3	7,4	59,2	19,5	124,6	37,9	107,8	16,4
AD-960110.1	36,5	2,7	62,2	15,6	64,7	6,4	82,5	12,4
AD-960116.1	26,8	3,5	62,4	10,8	78,8	10,9	81,0	12,9
AD-960434.1	64,8	7,8	63,1	19,2	79,0	6,8	111,8	14,9
AD-960430.1	75,9	11,5	67,0	8,7	111,9	8,6	103,9	4,9
AD-960305.1	54,3	7,1	68,7	18,0	83,3	9,3	106,2	24,0
AD-960279.1	97,3	25,7	69,3	1,5	138,6	43,7	108,2	17,4
AD-960298.1	82,1	2,0	72,0	18,4	81,0	18,2	97,0	22,4
AD-960284.1	91,4	20,3	74,0	11,1	103,5	15,0	115,2	20,0
AD-960313.1	88,5	3,6	74,6	18,9	116,9	17,3	96,1	8,5
AD-960432.1	77,1	6,5	76,4	8,3	94,7	20,2	103,7	10,5
AD-960124.1	62,0	6,5	76,7	9,3	110,4	22,7	115,3	9,8
AD-960119.1	78,8	6,0	77,7	6,6	106,5	24,1	140,7	8,0
AD-960437.1	101,3	8,8	77,7	11,6	98,4	23,9	116,1	21,1
AD-960315.1	84,1	10,8	79,6	8,0	107,5	13,0	103,5	4,3
AD-960117.1	82,4	28,4	81,8	8,8	126,7	10,4	118,9	17,6
AD-960311.1	82,6	12,2	82,3	8,7	138,1	20,4	112,0	24,6
AD-960272.1	90,8	17,5	84,1	4,2	114,7	13,2	90,1	4,8

AD-960414.1	105,6	23,4	84,5	4,9	117,2	13,8	113,6	24,8
AD-960240.1	81,0	9,2	85,6	14,5	98,0	5,1	95,5	27,7
AD-960286.1	87,4	6,6	85,8	11,8	122,0	17,0	101,7	2,6
AD-960281.1	119,9	27,1	86,6	23,2	120,5	17,4	112,4	6,8
AD-960277.1	126,8	14,6	94,8	21,3	166,0	68,5	99,9	13,6
AD-960274.1	120,6	27,3	95,6	17,5	128,4	17,1	123,9	27,1
AD-960108.1	79,8	6,1	95,8	17,5	103,7	9,4	96,7	11,4
AD-960239.1	106,5	19,7	95,9	13,8	112,7	16,0	109,3	10,7
AD-960122.1	100,1	10,3	96,3	3,1	132,0	3,7	117,6	8,3
AD-960291.1	111,5	17,5	96,3	18,2	99,9	18,0	125,3	23,6
AD-960125.1	134,2	17,5	98,0	12,3	122,9	17,1	100,1	12,4
AD-960231.1	95,9	17,6	99,4	23,7	99,8	27,2	99,9	23,1
AD-960275.1	69,0	6,8	99,7	7,9	93,7	14,8	137,6	22,2
AD-960173.1	81,3	13,7	99,8	30,0	96,3	19,1	104,6	28,9
AD-960271.1	94,3	8,3	100,1	5,2	106,7	13,0	101,9	14,3
AD-960433.1	165,5	10,3	101,1	10,9	145,3	26,4	101,8	9,0
AD-960267.1	114,1	6,1	101,4	8,4	105,4	23,3	112,1	4,1
AD-960236.1	95,8	5,7	101,8	10,5	106,6	25,8	110,3	13,0
AD-960310.1	112,9	9,5	103,5	13,1	106,6	16,8	112,8	19,0
AD-960312.1	106,2	3,8	103,8	17,4	147,1	31,1	107,2	8,8
AD-960309.1	91,5	6,4	107,7	14,0	104,1	14,2	100,7	23,9
AD-960440.1	106,8	12,6	110,3	15,5	89,7	23,6	108,7	17,4
AD-960237.1	129,8	8,4	113,2	15,2	101,1	18,6	127,7	5,6
AD-960268.1	100,0	8,7	114,3	5,7	97,1	5,1	89,3	16,4
AD-960269.1	134,7	14,3	118,2	10,1	107,5	21,8	131,1	22,3
AD-960280.1	83,9	4,5	121,9	23,0	116,0	20,5	118,5	41,7
AD-960270.1	122,8	11,5	122,1	13,0	102,7	15,9	114,3	16,2
AD-960273.1	149,2	4,7	142,6	33,3	107,4	10,5	145,7	16,6

Пример 3. Скрининг *in vivo* дуплексов дцРНК у мышей

Представляющие интерес дуплексы, идентифицированные в ходе вышеуказанных исследований *in vitro*, оценивали *in vivo*. В частности, в день -14 перед дозой мышью дикого типа (C57BL/6) трансдуцировали ретроорбитальным введением  $2 \times 10^{10}$  вирусных частиц вектора аденоассоциированного вируса 8 (AAV8), кодирующего человеческий АРОС3. В частности, мышам вводили AAV8, кодирующий мРНК АРОС3 человека, обозначаемый как AAV8-TBG-PI-АРОС3.

В день 0 группам из трех мышей подкожно вводили однократную дозу 3 мг/кг представляющих интерес агентов или контроль PBS. В таблице 8 представлены группы лечения и в таблице 9 представлены модифицированные нуклеотидные последовательности смысловой и антисмысловой цепей представляющих интерес дуплексов. На день 7 или день 14 после введения дозы животных умерщвляли, образцы печени собирали и быстро замораживали в жидком азоте. мРНК печени экстрагировали и анализировали методом количественной ПЦР в реальном времени.

Уровни мРНК АРОС3 человека сравнивали с геном домашнего хозяйства, GAPDH. Затем значения нормализовали к среднему значению для контрольной группы с носителем PBS. Данные были выражены в процентах от исходного значения и представлены как среднее значение плюс стандартное отклонение. Результаты, перечисленные в Таблице 10 и показанные на фиг. 1, демонстрируют, что протестированные репрезентативные дуплексные агенты эффективно снижают уровень матричной РНК человека АРОС3 *in vivo*.

Таблица 8. Группы лечения

Группа #	Животное #	Лечение	Доза	временная точка
1	1	PBS	n/a	D0, D7, D14
	2			
	3			
2	4	не получавший лечения	n/a	
	5			
	6			
3	7	AD-959917.1	3 мг/кг	
	8			
	9			
4	10	AD-960064.1		
	11			
	12			
5	13	AD-960293.1		
	14			
	15			
6	16	AD-960288.1		
	17			
	18			
7	19	AD-960445.1		
	20			
	21			

8	22	AD-960292.1
	23	
	24	
9	25	AD-960475.1
	26	
	27	
10	28	AD-960442.1
	29	
	30	
11	31	AD-960470.1
	32	
	33	
12	34	AD-960446.1
	35	
	36	
13	37	AD-960436.1
	38	
	39	
14	40	AD-960443.1
	41	
	42	
15	43	AD-960063.1
	44	
	45	
16	46	AD-960031.1
	47	
	48	
17	49	AD-959910.1
	50	
	51	
18	52	AD-960096.1
	53	
	54	
19	55	AD-959918.1

	56			
	57			
20	58	AD-80794.7		
	59			
	60			

Таблица 9. Интересующие дуплексы

ID Дуплекса	Диапазон в NM-000040.3
AD-959917.1	243-265
AD-960064.1	433-455
AD-960031.1	431-453
AD-960063.1	431-453
AD-960293.1	243-265
AD-960288.1	238-260
AD-960445.1	435-457
AD-960292.1	242-264
AD-960475.1	504-526
AD-960442.1	432-454
AD-960470.1	499-521
AD-960436.1	426-448
AD-960446.1	436-458
AD-960474.1	503-525
AD-960294.1	244-266
AD-960443.1	433-455
AD-80794.7	430-450
AD-959910.1	235-257

Таблица 10.

Дуплекс	D14			
	кПЦР в реальном времени печени		ELISA	
	% оставшихся мРНК	SD	Avg	SEM
PBS	100,56	10,81	173,05	34,36
не получавший лечения	105,57	1,84	125,40	46,86
AD-959917.1	38,42	16,51	63,57	13,65

AD-960064.1	16,01	2,36	36,97	15,66
AD-960293.1	60,82	17,10	119,00	12,04
AD-960288.1	75,24	14,48	99,64	12,46
AD-960445.1	19,60	7,46	61,84	1,26
AD-960292.1	91,68	22,51	78,59	3,24
AD-960475.1	61,18	20,12	73,65	14,56
AD-960442.1	55,63	17,52	91,45	8,10
AD-960470.1	31,48	9,94	87,10	13,53
AD-960446.1	34,44	5,34	62,84	11,40
AD-960436.1	35,50	9,98	68,61	17,47
AD-960443.1	60,00	3,61	88,72	8,31
AD-960063.1	14,64	7,30	42,19	2,84
AD-960031.1	11,45	5,18	20,57	5,87
AD-959910.1	67,13	13,87	59,45	0,75
AD-960096.1	22,96	8,58	13,15	3,40
AD-959918.1	76,69	7,97	51,37	3,33
AD-80794.7	23,00	15,59	17,38	3,01

Представляющие интерес дополнительные дуплексы, идентифицированные в ходе вышеуказанных исследований *in vitro*, оценивали *in vivo*. В частности, в день -14 перед дозой мышей дикого типа (C57BL/6) трансдуцировали ретроорбитальным введением  $2 \times 10^{10}$  вирусных частиц вектора аденоассоциированного вируса 8 (AAV8), кодирующего человеческий АРОС3. В частности, мышам вводили AAV8, кодирующий мРНК АРОС3 человека, обозначаемый как AAV8-TBG-PI-АРОС3.

В день 0 группам из трех мышей подкожно вводили однократную дозу 3 мг/кг представляющих интерес агентов или контроль PBS. В таблице 11 представлены группы лечения и в таблице 12 представлены модифицированные нуклеотидные последовательности смысловой и антисмысловой цепей представляющих интерес дуплексов. На день 7 или день 14 после введения дозы животных умерщвляли, образцы печени собирали и быстро замораживали в жидком азоте. мРНК печени экстрагировали и анализировали методом количественной ПЦР в реальном времени.

Уровни мРНК АРОС3 человека сравнивали с геном домашнего хозяйства, GAPDH. Затем значения нормализовали к среднему значению для контрольной группы с носителем PBS. Данные были выражены в процентах от исходного значения и представлены как среднее значение плюс стандартное отклонение. Результаты, перечисленные в таблице 13 и показанные на фиг. 2, демонстрируют, что протестированные репрезентативные дуплексные агенты эффективно снижают уровень матричной РНК человека АРОС3 *in vivo*.

Таблица 11. Группы лечения

Группа #	Животное #	Лечение	Доза	временная точка
1	1	PBS	n/a	D0, D7, D14
	2			
	3			
2	4	не получавший лечения	n/a	
	5			
	6			
3	7	AD-80794	3 мг/кг	
	8			
	9			
4	10	AD-959907		
	11			
	12			
5	13	AD-959914		
	14			
	15			
6	16	AD-959916		
	17			
	18			
7	19	AD-959932		
	20			
	21			
8	22	AD-959941		
	23			
	24			
9	25	AD-960030		
	26			
	27			
10	28	AD-960062		
	29			
	30			
11	31	AD-960064		

	32			
	33			
12	34	AD-960065		
	35			
	36			
13	37	AD-960066		
	38			
	39			
14	40	AD-960294		
	41			
	42			
15	43	AD-960314		
	44			
	45			
16	46	AD-960471		
	47			
	48			
17	49	AD-960474		
	50			
	51			
18	52	AD-960478		
	53			
	54			
19	55	AD-960481		
	56			
	57			

Таблица 12. Дополнительные интересующие дуплексы

ID Дуплекса	Диапазон в NM-000040.3
AD-80794.8	430-450
AD-959907.2	232-254
AD-959914.2	239-261
AD-959916.2	242-264
AD-959932.2	258-280

AD-960314.2	264-286
AD-959941.2	268-290
AD-960030.2	429-451
AD-960062.2	430-452
AD-960064.2	433-455
AD-960065.2	434-456
AD-960066.2	435-457
AD-960294.2	244-266
AD-960471.2	500-522
AD-960474.2	503-525
AD-960478.2	507-529
AD-960481.2	510-532

Таблица 13.

Дуплекс	% оставшихся мРНК	SD
PBS	102,94	34,16
не получавший лечения	97,12	15,32
AD-80794	15,17	8,74
AD-959907	49,60	35,60
AD-959914	75,84	20,55
AD-959916	51,81	27,99
AD-959932	62,36	13,32
AD-959941	55,60	17,44
AD-960030	10,26	2,93
AD-960062	24,91	9,81
AD-960064	20,04	8,94
AD-960065	38,62	18,89
AD-960066	20,93	5,78
AD-960294	73,30	24,03
AD-960314	48,32	31,10
AD-960471	39,24	28,51
AD-960474	30,81	15,15
AD-960478	47,27	7,36
AD-960481	37,22	9,27

#### Пример 4. Анализ зависимости активности от структуры

На основании анализов *in vitro* в примере 2 и анализов *in vivo* в примере 4 были проведены анализы зависимости активности от структуры (SAR). В частности, были разработаны, синтезированы и протестированы дополнительные дуплексы *in vitro* и *in vivo*. Дополнительные агенты были разработаны для нацеливания на нуклеотиды 429-455 или нуклеотиды 504-532 NM\_000040.3.

миРНК синтезировали и подвергали гибридизации с использованием обычных способов, известных в данной области и описанных выше.

Подробные списки немодифицированных последовательностей нуклеотидов смысловой и антисмысловой цепи АРОС3 показаны в Таблице 14. Подробные списки модифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи аполипопротеина С3 показаны в таблице 15.

Эксперименты по свободному поглощению проводили путем добавления 2,5 мкл дуплексов миРНК в PBS на лунку в 96-луночный планшет. Затем к миРНК добавляли полную среду для выращивания (47,5 мкл), содержащую примерно  $1,5 \times 10^4$  клеток Нер3В. Клетки инкубировали в течение 48 часов перед очисткой РНК и кПЦР в реальном времени, как описано выше. Эксперименты с однократной дозой проводили при конечной концентрации дуплекса 500 нМ, 100 нМ, 10 нМ и 1 нМ.

Для трансфекции клетки Нер3b (ATCC, Manassas, VA) выращивали почти до конfluence при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в минимальной эссенциальной среде Игла (Gibco) с добавлением 10% FBS (ATCC) перед высвобождением из планшета трипсинизацией. Трансфекцию осуществляли добавлением 7,5 мкл Opti-MEM плюс 0,1 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Carlsbad CA. cat # 13778-150) к 2,5 мкл каждого дуплекса миРНК на отдельную лунку 384-луночного планшета. Затем смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем к смеси миРНК добавляли сорок мкл полной ростовой среды без антибиотика, содержащей  $\sim 1,5 \times 10^4$  клеток Нер3В. Клетки инкубировали в течение 24 часов перед очисткой РНК. Эксперименты с однократной дозой проводили при конечной концентрации дуплекса 50 нМ, 10 нМ, 1 нМ и 0,1 нМ.

Выделение суммарной РНК с использованием DYNABEADS. Кратко, клетки лизировали в 10 мкл буфера для лизиса/связывания, содержащего 3 мкл гранул на лунку, и перемешивали в течение 10 минут на электростатическом шейкере. Стадии промывки были автоматизированы на Biotek EL406 с использованием магнитной опоры для пластин. Гранулы промывали (в 3 мкл) один раз в буфере А, один раз в буфере В и дважды в буфере Е с промежуточными стадиями аспирации. После последней аспирации в каждую лунку добавляли полную смесь 12 мкл RT смеси, как описано ниже.

Для синтеза кДНК в каждую лунку добавляли мастер-смесь из 1,5 мкл 10X буфера, 0,6 мкл 10X dNTP, 1,5 мкл произвольных праймеров, 0,75 мкл обратной транскриптазы, 0,75 мкл ингибитора РНКазы и 9,9 мкл H<sub>2</sub>O на лунку. Планшеты герметично закрывали, встряхивали в течение 10 минут на электростатическом шейкере, а затем инкубировали при

37°C в течение 2 часов. После этого планшеты встряхивали при 80°C в течение 8 минут.

кПЦР в реальном времени осуществляли, как описано выше, и относительное изменение кратности рассчитывали, как описано выше.

Результаты экспериментов по свободному поглощению агентов дцРНК, перечисленных в таблицах 14 и 15, показаны в таблице 16, а результаты анализов трансфекции агентов дцРНК, перечисленных в таблицах 14 и 15, в клетках Нер3В показаны в таблице 17.

Таблица 14. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи агентов дцРНК аполипопротеина С3

Название дуплекса	последовательность смысловой цепи 5'-3'	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_000040.3	последовательность антисмысловой цепи 5'-3'	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_000040.3
AD-80794.10	CUUAAAAGGGACAGUAU UCUA	13	434-452	UAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCA	58	432-452
AD-1143240.1	CUUAAAAGGGACAGUAU UCUA	13	434-452	UAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCA	58	432-452
AD-1143241.1	CUUAAAAGGGACAGUAU UCUA	13	434-452	UAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCA	58	432-452
AD-1143242.1	CUUAAAAGGGACAGUAU UCUA	13	434-452	UAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC	14	432-452
AD-1143243.1	CUUAAAAGGGACAGUAU UCUA	13	434-452	UAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC	14	432-452
AD-1143244.1	UAAAAGGGACAGUAUUC UA	299	434-452	UAGAAUACUGUCCCUUUUAAG	300	432-452
AD-1143245.1	UAAAAGGGACAGUAUUC UA	299	434-452	UAGAAUACUGUCCCUUUUAAG	300	432-452
AD-1143246.1	CUUAAAAGGGACAGUAU UCUA	13	432-452	UAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC	14	430-452
AD-1143247.1	CUUAAAAGGGACAGUAU UCUA	13	432-452	UAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC	14	430-452

AD-1143248.1	CUUAAAAGGGACAGUAU UCUA	13	432-452	UAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC	14	430-452
AD-1143249.1	CUUAAAAGGGACAGUAU UCUA	13	432-452	UAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC	14	430-452
AD-960030.3	GCUUAAAAGGGACAGUA UUCU	56	431-451	AGAAUACUGUCCCUUUUAAGCAA	57	429-451
AD-1143250.1	GCUUAAAAGGGACAGUA UUCU	56	431-451	AGAAUACUGUCCCUUUUAAGCAA	57	429-451
AD-1143251.1	GCUUAAAAGGGACAGUA UUCU	56	431-451	AGAAUACUGUCCCUUUUAAGCAA	57	429-451
AD-1143252.1	GCUUAAAAGGGACAGUA UUCU	56	431-451	AGAATACUGUCCCUUUUAAGCAA	301	429-451
AD-1143253.1	GCUUAAAAGGGACAGUA UUCU	56	431-451	AGAAUACUGUCCCUUUUAAGCGC	302	429-451
AD-1143254.1	GCUUAAAAGGGACAGUA UUCU	56	431-451	AGAATACUGUCCCUUUUAAGCGC	303	429-451
AD-1143255.1	UUAAAAGGGACAGUAUU CU	304	433-451	AGAAUACUGUCCCUUUUAAGC	305	431-451
AD-1143256.1	UUAAAAGGGACAGUAUU CU	304	433-451	AGAATACUGUCCCUUUUAAGC	306	431-451
AD-1143257.1	GCUUAAAAGGGACAGUA UUCU	56	431-451	AGAAUACUGUCCCUUUUAAGCGC	302	429-451

AD-1143258.1	GCUUAAAAGGGACAGUA UUCU	56	431-451	AGAATACUGUCCCUUUUAAGCGC	303	429-451
AD-1143259.1	GCUUAAAAGGGACAGUA UUCU	56	431-451	AGAAUACUGUCCCUUUUAAGCGC	302	429-451
AD-1143260.1	GCUUAAAAGGGACAGUA UUCU	56	431-451	AGAATACUGUCCCUUUUAAGCGC	303	429-451
AD-960031.3	UAAAAGGGACAGUAUUC UCAU	36	434-454	AUGAGAAUACUGUCCCUUUUAAG	37	432-454
AD-1143261.1	UAAAAGGGACAGUAUUU UCAU	307	434-454	AUGAAAAUACUGUCCCUUUUAAG	308	432-454
AD-1143262.1	UAAAAGGGACAGUAUUC UCAU	36	434-454	AUGAGAAUACUGUCCCUUUUAAG	37	432-454
AD-1143263.1	UAAAAGGGACAGUAUUC UCAU	36	434-454	AUGAGAAUACUGUCCCUUUUAAG	37	432-454
AD-1143264.1	UAAAAGGGACAGUAUUC UCAU	36	434-454	AUGAGAAUACUGUCCCUUUUACC	309	432-454
AD-1143265.1	UAAAAGGGACAGUAUUC UCAU	36	434-454	AUGAGAAUACUGUCCCUUUUACC	309	432-454
AD-1143266.1	AAAGGGACAGUAUUCUC AU	310	436-454	AUGAGAAUACUGUCCCUUUUG	311	434-454
AD-1143267.1	AAAGGGACAGUAUUCUC AU	310	436-454	AUGAGAAUACUGUCCCUUUUG	311	434-454

AD-1143268.1	UAAAAGGGACAGUAUUC UCAU	36	434-454	AUGAGAAUACUGUCCCUUUUACC	309	432-454
AD-1143269.1	AAAAAGGGACAGUAUUC UCAU	312	434-454	AUGAGAAUACUGUCCCUUUUGCC	313	432-454
AD-1143270.1	UAAAAGGGACAGUAUUC UCAU	36	434-454	AUGAGAAUACUGUCCCUUUUACC	309	432-454
AD-1143271.1	UAAAAGGGACAGTAUUC UCAU	314	434-454	AUGAGAAUACUGUCCCUUUUACC	309	432-454
AD-1143272.1	UAAAAGGGACAGTAUUC UCAU	314	434-454	AUGAGAAUACUGUCCCUUUUACC	309	432-454
AD-1143273.1	UAAAAGGGACAGUAUUC UCAU	36	434-454	AUGAGAAUACUGUCCCUUUUAAG	37	432-454
AD-1143274.1	UAAAAGGGACAGTAUUC UCAU	314	434-454	AUGAGAAUACUGUCCCUUUUAAG	37	432-454
AD-960062.3	CUUAAAAGGGACAGUAU UCUU	48	432-452	AAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCA	49	430-452
AD-1143275.1	CUUAAAAGGGACAGUAU UCUU	48	432-452	AAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCA	49	430-452
AD-1143276.1	CUUAAAAGGGACAGUAU UCUU	48	432-452	AAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCA	49	430-452
AD-1143277.1	CUUAAAAGGGACAGUAU UCUU	48	432-452	AAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC	315	430-452

AD-1143278.1	CUUAAAAGGGACAGUAU UCUU	48	432-452	AAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC	315	430-452
AD-1143279.1	UAAAAGGGACAGUAUUC UU	316	434-452	AAGAAUACUGUCCCUUUUAAG	317	432-452
AD-1143280.1	UAAAAGGGACAGUAUUC UU	316	434-452	AAGAAUACUGUCCCUUUUAAG	317	432-452
AD-1143281.1	CUUAAAAGGGACAGUAU UCUU	48	432-452	AAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC	315	430-452
AD-1143282.1	CUUAAAAGGGACAGUAU UCUU	48	432-452	AAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC	315	430-452
AD-1143283.1	CUUAAAAGGGACAGUAU UCUU	48	432-452	AAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC	315	430-452
AD-1143284.1	CUUAAAAGGGACAGUAU UCUU	48	432-452	AAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC	315	430-452
AD-960064.3	AAAAGGGACAGUAUUCU CAGU	30	435-455	ACUGAGAAUACUGUCCCUUUUAA	31	433-455
AD-1143285.1	AAAAGGGACAGUAUUCU CAGU	30	435-455	ACUGAGAAUACUGUCCCUUUUAA	31	433-455
AD-1143286.1	AAAAGGGACAGUAUUCU CAGU	30	435-455	ACUGAGAAUACUGUCCCUUUUAA	31	433-455
AD-1143287.1	AAAAGGGACAGUAUUCU CAGU	30	435-455	ACUGAGAAUACUGUCCCUUUUGC	318	433-455

AD-1143288.1	AAAAGGGACAGUAUUCU CAGU	30	435-455	ACUGAGAAUACUGUCCCCUUUUC	319	433-455
AD-1143289.1	AAGGGACAGUAUUCUCA GU	320	437-455	ACUGAGAAUACUGUCCCCUUUU	321	435-455
AD-1143290.1	AAAAGGGACAGUAUUCU CAGU	30	435-455	ACUGAGAAUACUGUCCCCUUUUGC	318	433-455
AD-1143291.1	AAAAGGGACAGUAUUCU CAGU	30	435-455	ACUGAGAAUACUGUCCCCUUUUC	319	433-455
AD-1143292.1	AAAAGGGACAGUAUUUU CAGU	322	435-455	ACUGAAAAUACUGUCCCCUUUUGC	323	433-455
AD-1143293.1	AAAAGGGACAGUAUUCU CAGU	30	435-455	ACUGAGAAUACUGUCCCCUUUUGC	318	433-455
AD-1143294.1	AAAAGGGACAGUAUUCU CAGU	30	435-455	ACUGAGAAUACUGUCCCCUUUUC	319	433-455
AD-1143295.1	AAAAGGGACAGUAUUCU CAGU	30	435-455	ACUGAGAAUACUGUCCCCUUUUGC	318	433-455
AD-1143296.1	AAAAGGGACAGUAUUCU CAGU	30	435-455	ACUGAGAAUACUGUCCCCUUUUC	319	433-455
AD-960096.3	CCAUAAGCUGGACAA GAU	28	506-526	AUUCUUGUCCAGCUUUAUUGGGA	29	504-526
AD-1143297.1	CCAUAAGCUGGAUAA GAU	324	506-526	AUUCUUAUCCAGCUUUAUUGGGA	325	504-526

AD-1143298.1	CCAAUAAAGCUGGACAA GAAU	28	506-526	AUUCTUGUCCAGCUUUAUUGGGA	326	504-526
AD-1143299.1	CCAAUAAAGCUGGACAA GAAU	28	506-526	AUUCTUGUCCAGCUUUAUUGGGC	327	504-526
AD-1143300.1	AAUAAAGCUGGACAAGA AU	328	508-526	AUUCTUGUCCAGCUUUAUUGG	329	506-526
AD-1143301.1	AAUAAAGCUGGACAAGA AU	328	508-526	AUUCTUGUCCAGCUUUAUUCC	330	506-526
AD-1143302.1	CCAAUAAAGCUGGACAA GAAU	28	506-526	AUUCTUGUCCAGCUUUAUUGGGC	327	504-526
AD-1143303.1	CCAAUAAAGCUGGACAA GAAU	28	506-526	AUUCTUGUCCAGCUUUAUUGG	329	506-526
AD-1143304.1	CCAAUAAAGCUGGACAA GAAU	28	506-526	AUUCTUGUCCAGCUUUAUUGGGC	327	504-526
AD-1143305.1	CCAAUAAAGCUGGACAA GAAU	28	506-526	AUUCTUGUCCAGCUUUAUUGG	329	506-526
AD-1143306.1	CCAAUAAAGCUGGACAA GAAU	28	506-526	AUUCUUGUCCAGCUUUAUUGGGA	29	504-526
AD-1143307.1	CCAAUAAAGCUGGACAA GAAU	28	506-526	AUUCUUGUCCAGCUUUAUUGGGA	29	504-526
AD-960481.3	AAGCUGGACAAGAAGCU GCUU	99	512-532	AAGCAGCUUCUUGUCCAGCUUUA	100	510-532

AD-1143308.1	AAGCUGGACAAGAAGCU GCUU	99	512-532	AAGCAGCUUCUUGUCCAGCUUUA	100	510-532
AD-1143309.1	AAGCUGGACAAGAAGCU GCUU	99	512-532	AAGCAGCUUCUUGUCCAGCUUUA	100	510-532
AD-1143310.1	AAGCUGGACAAGAAGCU GCUU	99	512-532	AAGCAGCUUCUUGUCCAGCUUUA	100	510-532
AD-1143311.1	AAGCUGGACAAGAAGCU GCUU	99	512-532	AAGCAGCUUCUUGUCCAGCUUUC	331	510-532
AD-1143312.1	AAGCUGGACAAGAAGCU GCUU	99	512-532	AAGCAGCUUCUUGUCCAGCUUUC	331	510-532
AD-1143313.1	AAGCUGGACAAGAAGCU GCUU	99	512-532	AAGCAGCUUCUUGUCCAGCUUCC	332	510-532
AD-1143314.1	AAGCUGGACAAGAAGCU GCUU	99	512-532	AAGCAGCUUCUUGUCCAGCUUCC	332	510-532
AD-1143315.1	GCUGGACAAGAAGCUGC UU	333	514-532	AAGCAGCUUCUUGUCCAGCUU	334	512-532
AD-1143316.1	GCUGGACAAGAAGCUGC UU	333	514-532	AAGCAGCUUCUUGUCCAGCUU	334	512-532
AD-1143317.1	AAGCUGGACAAGAAGCU GCUU	99	512-532	AAGCAGCUUCUUGUCCAGCUUCC	332	510-532
AD-1143318.1	AAGCUGGACAAGAAGCU GCUU	99	512-532	AAGCAGCUUCUUGUCCAGCUUCC	332	510-532

AD-1143319.1	AAGCUGGACAAGAAGCU GCUU	99	512-532	AAGCAGCUUCUUGUCCAGCUUCC	332	510-532
AD-1143320.1	AAGCUGGACAAGAAGCU GCUU	99	512-532	AAGCAGCUUCUUGUCCAGCUUCC	332	510-532
AD-1143321.1	AAGCUGGACAAGAAGCU ACUU	335	512-532	AAGUAGCUUCUUGUCCAGCUUCC	336	510-532
AD-1143322.1	AAGCUGGACAAGAAGUU GCUU	337	512-532	AAGCAACUUCUUGUCCAGCUUCC	338	510-532
AD-1183925	AAGCUGGACAAGAAGCU GCUU	99	512-532	AAGCAGCUUCUUGUCCAGCUUUC	331	510-532
AD-1183926	GCUGGACAAGAAGCUGC UU	333	514-532	AAGCAGCUUCUUGUCCAGCUU	334	512-532
AD-1019001	ACGGGACAGUAUUCUCA GUA	339	437-456	UCACUGAGAAUACUGUCCCGU	340	437-457

Таблица 15. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи агентов дцРНК аполипопротеина С3

Название дуплекса	последовательность смысловой цепи 5'-3'	SEQ ID NO:	последовательность антисмысловой цепи 5'-3'	SEQ ID NO:	Последовательность-мишень мРНК	SEQ ID NO:
AD-80794.10	csusuaaaAfgGfGfAfcaguuuuaL96	17	usAfsgaaUfaCfUfguccCfuUfuuaagscsa	392	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUC	828
AD-	csusuaaaAfgGfGfAfcaguuuuaL96	17	usAfsgaaUfacuguccCfuUfuuaagscsa	829	CUUAAAAGGGACAGUA	828

1143240.1					UUCUC	
AD- 1143241.1	csusuaaaAfgGfGfAfcagauuucuaL96	17	usdAsgaaUfacuguccCfuUfuuaagscsa	830	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUC	828
AD- 1143242.1	csusuaaaAfgGfGfAfcagauuucuaL96	17	usAfsгааUfacuguccCfuUfuuaagscsc	831	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUC	828
AD- 1143243.1	csusuaaaAfgGfGfAfcagauuucuaL96	17	usdAsgadAudAcuguccCfuUfuuaagscsc	16	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUC	828
AD- 1143244.1	usasaaAfgGfGfAfcagauuucuaL96	832	usAfsгааUfacuguccCfuUfuuasasg	833	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUC	828
AD- 1143245.1	usasaaAfgGfGfAfcagauuucuaL96	832	usdAsgadAudAcuguccCfuUfuuasasg	834	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUC	828
AD- 1143246.1	csusuaaaagdGgdAcagauuucuaL96	835	usAfsгааUfacuguccCfuUfuuaagscsc	831	UGC U U A A A A G G G A C A G U A U U C U C	379
AD- 1143247.1	csusuaaaagdGgdAcagauuucuaL96	835	usdAsgadAudAcuguccCfuUfuuaagscsc	16	UGC U U A A A A G G G A C A G U A U U C U C	379
AD- 1143248.1	csusuaaaagdGgdACfagauuucuaL96	836	usAfsгааUfacuguccCfuUfuuaagscsc	831	UGC U U A A A A G G G A C A G U A U U C U C	379
AD- 1143249.1	csusuaaaagdGgdACfagauuucuaL96	836	usdAsgadAudAcuguccCfuUfuuaagscsc	16	UGC U U A A A A G G G A C A G U A U U C U C	379
AD- 960030.3	gscsuuaaAfaGfGfGfacagauuucuaL96	389	asGfsaaUfcUfGfuccUfuUfuuaagsasa	390	UUGCUUAAAAGGGACA GUAUUCU	391
AD- 1143249.1	gscsuuaaAfaGfGfGfacagauuucuaL96	389	asGfsaaUfcuguccUfuUfuuaagsasa	837	UUGCUUAAAAGGGACA	391

1143250.1					GUAUUCU	
AD- 1143251.1	gscsuuaaAfaGfGfGfacaguauucuL96	389	asdGsaauAfcugucccUfuUfuaagcsasa	838	UUGCUUAAAAGGGACA GUAUUCU	391
AD- 1143252.1	gscsuuaaAfaGfGfGfacaguauucuL96	389	asdGsaadTadCugucccUfuUfuaagcsasa	839	UUGCUUAAAAGGGACA GUAUUCU	391
AD- 1143253.1	gscsuuaaAfaGfGfGfacaguauucuL96	389	asdGsaauAfcugucccUfuUfuaagcsgsc	840	UUGCUUAAAAGGGACA GUAUUCU	391
AD- 1143254.1	gscsuuaaAfaGfGfGfacaguauucuL96	389	asdGsaadTadCugucccUfuUfuaagcsgsc	841	UUGCUUAAAAGGGACA GUAUUCU	391
AD- 1143255.1	ususaaAfaGfGfGfacaguauucuL96	842	asdGsaauAfcugucccUfuUfuaasgsc	843	GCUUAAAAGGGACAGU AUUCU	844
AD- 1143256.1	ususaaAfaGfGfGfacaguauucuL96	842	asdGsaadTadCugucccUfuUfuaasgsc	845	GCUUAAAAGGGACAGU AUUCU	844
AD- 1143257.1	gscsuuaaadGgdGacaguauucuL96	846	asdGsaauAfcugucccUfuUfuaagcsgsc	840	UUGCUUAAAAGGGACA GUAUUCU	391
AD- 1143258.1	gscsuuaaadGgdGacaguauucuL96	846	asdGsaadTadCugucccUfuUfuaagcsgsc	841	UUGCUUAAAAGGGACA GUAUUCU	391
AD- 1143259.1	gscsuuaaadGgdGadCaguauucuL96	847	asdGsaauAfcugucccUfuUfuaagcsgsc	840	UUGCUUAAAAGGGACA GUAUUCU	391
AD- 1143260.1	gscsuuaaadGgdGadCaguauucuL96	847	asdGsaadTadCugucccUfuUfuaagcsgsc	841	UUGCUUAAAAGGGACA GUAUUCU	391
AD- 1143261.1	usasaagGfgAfCfAfguauucucauL96	359	asUfsgagAfaUfAfcuguCfcCfuuuuasag	360	CUUAAAAGGGACAGUA	361

960031.3					UUCUCAG	
AD- 1143261.1	usasaagGfgAfCfAfguauuucauL96	848	asUfsgaaAfaUfAfcuguCfcCfuuuuasag	849	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUCAG	361
AD- 1143262.1	usasaagGfgAfCfAfguauucucuL96	359	asUfsgadGa(Agn)uacuguCfcCfuuuuasag	850	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUCAG	361
AD- 1143263.1	usasaagGfgAfCfAfguauucucuL96	359	asUfsgadGa(A2p)uacuguCfcCfuuuuasag	851	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUCAG	361
AD- 1143264.1	usasaagGfgAfCfAfguauucucuL96	359	asUfsgadGa(Agn)uacuguCfcCfuuuuascsc	852	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUCAG	361
AD- 1143265.1	usasaagGfgAfCfAfguauucucuL96	359	asUfsgadGa(A2p)uacuguCfcCfuuuuascsc	853	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUCAG	361
AD- 1143266.1	asasagGfgAfCfAfguauucucuL96	854	asUfsgadGa(Agn)uacuguCfcCfuuusug	855	UAAAAGGGACAGUAUU CUCAG	856
AD- 1143267.1	asasagGfgAfCfAfguauucucuL96	854	asUfsgadGa(A2p)uacuguCfcCfuuusug	857	UAAAAGGGACAGUAUU CUCAG	856
AD- 1143268.1	usasaagggdAcdAguauucucuL96	858	asUfsgadGa(Agn)uacuguCfcCfuuuuascsc	852	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUCAG	361
AD- 1143269.1	asasaagggdAcdAguauucucuL96	859	asUfsgadGa(Agn)uacuguCfcCfuuuugsesc	860	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUCAG	361
AD- 1143270.1	usasaagggdAcdAguauucucuL96	858	asUfsgadGa(A2p)uacuguCfcCfuuuuascsc	853	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUCAG	361
AD- 1143271.1	usasaagggdAcdAgdTauucucuL96	861	asUfsgadGa(Agn)uacuguCfcCfuuuuascsc	852	CUUAAAAGGGACAGUA	361

1143271.1					UUCUCAG	
AD- 1143272.1	usasaaagggdAcdAgdTauucucauL96	861	asUfsgadGa(A2p)uacuguCfcCfuuuuasesc	853	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUCAG	361
AD- 1143273.1	usasaaagggdAcdAguauucucauL96	858	asUfsgadGadAuacuguCfcCfuuuuasasg	862	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUCAG	361
AD- 1143274.1	usasaaagggdAcdAgdTauucucauL96	861	asUfsgadGadAuacuguCfcCfuuuuasasg	862	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUCAG	361
AD- 960062.3	csusuaaaAfgGfGfAfcaguuucuuL96	377	asAfsгааUfaCfUfguccCfuUfuuaagscsa	378	UGC U U A A A A G G G A C A G U A U U C U C	379
AD- 1143275.1	csusuaaaAfgGfGfAfcaguuucuuL96	377	asAfsгааUfacuguccCfuUfuuaagscsa	863	UGC U U A A A A G G G A C A G U A U U C U C	379
AD- 1143276.1	csusuaaaAfgGfGfAfcaguuucuuL96	377	asdAsgaaUfacuguccCfuUfuuaagscsa	864	UGC U U A A A A G G G A C A G U A U U C U C	379
AD- 1143277.1	csusuaaaAfgGfGfAfcaguuucuuL96	377	asdAsgaaUfacuguccCfuUfuuaagscsc	865	UGC U U A A A A G G G A C A G U A U U C U C	379
AD- 1143278.1	csusuaaaAfgGfGfAfcaguuucuuL96	377	asdAsgadAudAcuguccCfuUfuuaagscsc	866	UGC U U A A A A G G G A C A G U A U U C U C	379
AD- 1143279.1	usasaaAfgGfGfAfcaguuucuuL96	867	asdAsgaaUfacuguccCfuUfuuasasg	868	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUC	828
AD- 1143280.1	usasaaAfgGfGfAfcaguuucuuL96	867	asdAsgadAudAcuguccCfuUfuuasasg	869	CUUAAAAGGGACAGUA UUCUC	828
AD- 1143281.1	csusuaaaagdGgdAcaguuucuuL96	870	asdAsgaaUfacuguccCfuUfuuaagscsc	865	UGC U U A A A A G G G A C A G	379

1143281.1					UAUUCUC	
AD- 1143282.1	csusuaaaagdGgdAcaguauucuuL96	870	asdAsgadAudAcuguccCfuUfuuaagsesc	866	UGC U U A A A A G G G A C A G UAUUCUC	379
AD- 1143283.1	csusuaaaagdGgdAcdAguauucuuL96	871	asdAsgaaUfacuguccCfuUfuuaagsesc	865	UGC U U A A A A G G G A C A G UAUUCUC	379
AD- 1143284.1	csusuaaaagdGgdAcdAguauucuuL96	871	asdAsgadAudAcuguccCfuUfuuaagsesc	866	UGC U U A A A A G G G A C A G UAUUCUC	379
AD- 960064.3	asasaaggGfaCfAfGfuauucucaguL96	350	asCfsugaGfaAfUfacugUfcCfcuuusasa	351	U U A A A A G G G A C A G U A U U C U C A G U	352
AD- 1143285.1	asasaaggGfaCfAfGfuauucucaguL96	350	asCfsugaGfaauacugUfcCfcuuusasa	872	U U A A A A G G G A C A G U A U U C U C A G U	352
AD- 1143286.1	asasaaggGfaCfAfGfuauucucaguL96	350	asCfsugdAgdAauacugUfcCfcuuusasa	873	U U A A A A G G G A C A G U A U U C U C A G U	352
AD- 1143287.1	asasaaggGfaCfAfGfuauucucaguL96	350	asCfsugdAgdAauacugUfcCfcuuusgsc	874	U U A A A A G G G A C A G U A U U C U C A G U	352
AD- 1143288.1	asasaaggGfaCfAfGfuauucucaguL96	350	asCfsugdAgdAauacugUfcCfcuuusesc	875	U U A A A A G G G A C A G U A U U C U C A G U	352
AD- 1143289.1	asasggGfaCfAfGfuauucucaguL96	876	asCfsugdAgdAauacugUfcCfcuususu	877	A A A A G G G A C A G U A U U C U C A G U	878
AD- 1143290.1	asasaagggaCfadGuauucucaguL96	879	asCfsugdAgdAauacugUfcCfcuuusgsc	874	U U A A A A G G G A C A G U A U U C U C A G U	352
AD- 1143290.1	asasaagggaCfadGuauucucaguL96	879	asCfsugdAgdAauacugUfcCfcuuusesc	875	U U A A A A G G G A C A G U A U	352

1143291.1					UCUCAGU	
AD- 1143292.1	asasaagggaCfadGuauuuucaguL96	880	asCfsugdAadAauacugUfcCfcuuuusgsc	881	UUAAAAGGGACAGUAU UCUCAGU	352
AD- 1143293.1	asasaagggadCadGuauucucaguL96	882	asCfsugdAgdAauacugUfcCfcuuuusgsc	874	UUAAAAGGGACAGUAU UCUCAGU	352
AD- 1143294.1	asasaagggadCadGuauucucaguL96	882	asCfsugdAgdAauacugUfcCfcuuuuscs	875	UUAAAAGGGACAGUAU UCUCAGU	352
AD- 1143295.1	asasaagggadCadGUfauucucaguL96	883	asCfsugdAgdAauacugUfcCfcuuuusgsc	874	UUAAAAGGGACAGUAU UCUCAGU	352
AD- 1143296.1	asasaagggadCadGUfauucucaguL96	883	asCfsugdAgdAauacugUfcCfcuuuuscs	875	UUAAAAGGGACAGUAU UCUCAGU	352
AD- 960096.3	cscsaauaAfaGfCfUfggacaagaauL96	347	asUfsucuUfgUfcfcagcUfuUfauuggsgsa	348	UCCCAAUAAAGCUGGA CAAGAAG	349
AD- 1143297.1	cscsaauaAfaGfCfUfggauaagaauL96	884	asUfsucuUfauccagcUfuUfauuggsgsa	885	UCCCAAUAAAGCUGGA CAAGAAG	349
AD- 1143298.1	cscsaauaAfaGfCfUfggacaagaauL96	347	asUfsucdTu(G2p)uccagcUfuUfauuggsgsa	886	UCCCAAUAAAGCUGGA CAAGAAG	349
AD- 1143299.1	cscsaauaAfaGfCfUfggacaagaauL96	347	asUfsucdTu(G2p)uccagcUfuUfauuggsgsc	887	UCCCAAUAAAGCUGGA CAAGAAG	349
AD- 1143300.1	asasuaAfaGfCfUfggacaagaauL96	888	asUfsucdTu(G2p)uccagcUfuUfauusgsg	889	CCAAUAAAGCUGGACA AGAAG	890
AD- 1143300.1	asasuaAfaGfCfUfggacaagaauL96	888	asUfsucdTu(G2p)uccagcUfuUfauuscsc	891	CCAAUAAAGCUGGACA	890

1143301.1					AGAAG	
AD- 1143302.1	cscsaauaaagCfUfggacaagaauL96	892	asUfsucdTu(G2p)uccagcUfuUfauuggsgsc	887	UCCCAAUAAAGCUGGA CAAGAAG	349
AD- 1143303.1	cscsaauaaagCfUfggacaagaauL96	892	asUfsucdTu(G2p)uccagcUfuUfauusgsg	889	CCAAUAAAGCUGGACA AGAAG	890
AD- 1143304.1	cscsaauadAagCfUfggacaagaauL96	893	asUfsucdTu(G2p)uccagcUfuUfauuggsgsc	887	UCCCAAUAAAGCUGGA CAAGAAG	349
AD- 1143305.1	cscsaauadAagCfUfggacaagaauL96	893	asUfsucdTu(G2p)uccagcUfuUfauusgsg	889	CCAAUAAAGCUGGACA AGAAG	890
AD- 1143306.1	cscsaauaaagCfUfggacaagaauL96	892	asUfsucuUfguccagcUfuUfauuggsgsa	894	UCCCAAUAAAGCUGGA CAAGAAG	349
AD- 1143307.1	cscsaauadAagCfUfggacaagaauL96	893	asUfsucuUfguccagcUfuUfauuggsgsa	894	UCCCAAUAAAGCUGGA CAAGAAG	349
AD- 960481.3	asasgcugGfaCfAfAfgaagcugcuuL96	454	asAfsgcag(Cgn)uucuugUfcCfagcuususa	718	UAAAGCUGGACAAGAA GCUGCUA	456
AD- 1143308.1	asasgcugGfaCfAfAfgaagcugcuuL96	454	asAfsgcdAg(Cgn)uucuugUfcCfagcuususa	895	UAAAGCUGGACAAGAA GCUGCUA	456
AD- 1143309.1	asasgcugGfaCfAfAfgaagcugcuuL96	454	asdAsgcdAg(Cgn)uucuugUfcCfagcuususa	896	UAAAGCUGGACAAGAA GCUGCUA	456
AD- 1143310.1	asasgcugGfaCfAfAfgaagcugcuuL96	454	asdAsgcdAg(C2p)uucuugUfcCfagcuususa	897	UAAAGCUGGACAAGAA GCUGCUA	456
AD- 1143311.1	asasgcugGfaCfAfAfgaagcugcuuL96	454	asdAsgcdAg(Cgn)uucuugUfcCfagcuususc	898	UAAAGCUGGACAAGAA	456

1143311.1					GCUGCUA	
AD- 1143312.1	asasgcugGfaCfAfAfgaagcugcuuL96	454	asdAsgcdAg(C2p)uucuugUfcCfagcuususc	899	UAAAGCUGGACAAGAA GCUGCUA	456
AD- 1143313.1	asasgcugGfaCfAfAfgaagcugcuuL96	454	asdAsgcdAg(Cgn)uucuugUfcCfagcuususc	900	UAAAGCUGGACAAGAA GCUGCUA	456
AD- 1143314.1	asasgcugGfaCfAfAfgaagcugcuuL96	454	asdAsgcdAg(C2p)uucuugUfcCfagcuususc	901	UAAAGCUGGACAAGAA GCUGCUA	456
AD- 1143315.1	gscsugGfaCfAfAfgaagcugcuuL96	902	asdAsgcdAg(Cgn)uucuugUfcCfagcsusu	903	AAGCUGGACAAGAAGC UGC UA	904
AD- 1143316.1	gscsugGfaCfAfAfgaagcugcuuL96	902	asdAsgcdAg(C2p)uucuugUfcCfagcsusu	905	AAGCUGGACAAGAAGC UGC UA	904
AD- 1143317.1	asasgcuggaCfadAgaagcugcuuL96	906	asdAsgcdAg(Cgn)uucuugUfcCfagcuususc	900	UAAAGCUGGACAAGAA GCUGCUA	456
AD- 1143318.1	asasgcuggaCfadAgaagcugcuuL96	906	asdAsgcdAg(C2p)uucuugUfcCfagcuususc	901	UAAAGCUGGACAAGAA GCUGCUA	456
AD- 1143319.1	asasgcuggaCfadAgaagcugcuuL96	907	asdAsgcdAg(Cgn)uucuugUfcCfagcuususc	900	UAAAGCUGGACAAGAA GCUGCUA	456
AD- 1143320.1	asasgcuggaCfadAgaagcugcuuL96	907	asdAsgcdAg(C2p)uucuugUfcCfagcuususc	901	UAAAGCUGGACAAGAA GCUGCUA	456
AD- 1143321.1	asasgcuggaCfadAgaagcuacuuL96	908	asdAsgudAg(C2p)uucuugUfcCfagcuususc	909	UAAAGCUGGACAAGAA GCUGCUA	456
AD- 1143322.1	asasgcuggaCfadAgaaguugcuuL96	910	asdAsgcdAa(C2p)uucuugUfcCfagcuususc	911	UAAAGCUGGACAAGAA	456

1143322.1					GCUGCUA	
AD- 1183925	asasgcuggaCfAfAfgaagcugcuuL96	912	asdAsgcdAg(C2p)uucuugUfcCfagcuususc	899	UAAAGCUGGACAAGAA GCUGCUA	456
AD- 1183926	gscsuggaCfAfAfgaagcugcuuL96	913	asdAsgcdAg(C2p)uucuugUfcCfagcsusu	905	AAGCUGGACAAGAAGC UGC UA	904
AD- 1019001	Y44sacgggacaGfUfAfuucucaguiasY44	914	usCfsasCfuGfagaauAfcUfgUfcCfcGfsu	915	AAGGGACAGUAUUCUC AGUGC	916

Таблица 16. Скрининг свободного поглощения однократной дозы в клетках Нер3В

Название дуплека	500 нМ		100 нМ		10 нМ		1 нМ	
	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD
AD- 80794.10	50,01	2,91	57,23	3,03	73,67	4,07	92,13	2,45
AD- 1143240.1	59,83	5,91	62,99	4,12	75,71	3,36	90,44	4,01
AD- 1143241.1	46,00	2,20	51,40	2,74	70,00	5,07	87,46	2,15
AD- 1143242.1	46,98	2,67	57,58	4,13	74,48	4,89	85,07	2,08
AD- 1143243.1	32,17	2,39	37,22	2,97	62,41	5,86	83,22	3,83
AD- 1143244.1	61,26	3,79	65,51	3,33	70,95	4,64	86,55	1,88
AD- 1143245.1	29,99	2,62	38,17	2,32	57,74	5,64	81,92	3,13
AD- 1143246.1	104,48	22,29	76,68	3,36	84,88	3,76	91,31	6,20
AD- 1143247.1	49,96	1,22	57,75	3,51	76,50	6,15	86,40	1,72
AD- 1143248.1	76,38	2,07	81,24	4,83	90,92	6,41	91,34	2,56
AD- 1143249.1	47,94	1,92	53,80	3,52	74,14	2,76	89,48	3,45
AD- 960030.3	41,64	0,96	49,21	2,30	70,81	4,30	90,77	7,86
AD- 1143250.1	43,66	1,99	50,06	2,06	71,09	1,41	88,52	1,54
AD- 1143251.1	44,46	2,85	53,43	0,48	70,58	4,73	87,93	2,59
AD- 1143252.1	35,28	4,47	39,27	3,04	63,45	2,88	84,67	3,62

AD-1143253.1	45,97	4,59	48,91	3,12	72,50	3,30	85,82	2,60
AD-1143254.1	33,14	1,27	39,94	2,86	67,59	4,55	85,51	1,63
AD-1143255.1	22,44	3,31	33,91	6,67	53,15	3,97	80,09	3,20
AD-1143256.1	12,09	1,29	18,11	1,50	54,06	9,34	75,50	2,77
AD-1143257.1	108,85	5,61	93,98	5,84	92,13	5,41	93,92	3,11
AD-1143258.1	84,74	1,55	82,30	2,97	85,54	5,46	93,59	2,95
AD-1143259.1	84,03	3,05	88,74	1,41	85,29	2,51	100,73	15,35
AD-1143260.1	87,46	3,43	78,59	4,36	83,55	2,88	91,04	3,38
AD-960031.3	29,38	3,85	41,40	6,94	62,15	5,10	83,65	3,72
AD-1143261.1	96,26	12,69	97,98	11,29	88,10	5,65	94,22	4,29
AD-1143262.1	76,29	3,64	75,61	2,89	90,82	7,38	95,42	4,11
AD-1143263.1	48,38	9,73	61,04	5,42	81,86	3,97	92,05	5,07
AD-1143264.1	66,67	3,82	76,51	1,92	84,98	1,39	91,16	1,37
AD-1143265.1	68,17	13,37	77,06	12,29	81,83	3,04	92,15	6,59
AD-1143266.1	74,35	11,32	68,43	4,30	82,16	4,30	96,14	13,04
AD-1143267.1	44,99	5,20	64,81	10,27	78,18	9,28	89,68	4,66
AD-1143268.1	75,66	8,75	91,75	14,39	89,63	5,81	100,77	5,48

AD-1143269.1	70,81	3,28	84,12	5,28	95,03	5,00	97,24	7,30
AD-1143270.1	71,74	4,79	78,83	3,42	92,89	4,17	95,82	5,96
AD-1143271.1	71,77	5,30	76,02	3,43	91,08	9,11	95,56	3,23
AD-1143272.1	69,18	1,04	77,97	1,16	91,30	7,61	90,72	2,88
AD-1143273.1	46,11	5,48	58,47	5,63	79,00	5,34	86,46	2,44
AD-1143274.1	57,35	7,81	59,49	3,88	82,43	4,08	94,65	5,38
AD-960062.3	42,21	6,42	58,97	13,39	76,38	11,22	100,56	15,42
AD-1143275.1	54,25	10,60	67,40	11,53	80,59	6,62	108,48	13,17
AD-1143276.1	57,96	3,63	64,19	4,11	80,40	1,72	91,66	2,79
AD-1143277.1	60,46	6,29	73,08	8,35	114,87	n/a	95,41	7,44
AD-1143278.1	30,74	2,87	46,93	7,31	75,59	3,54	90,06	12,78
AD-1143279.1	46,16	2,13	63,91	11,43	84,18	4,57	89,02	3,39
AD-1143280.1	26,65	6,19	39,95	8,20	71,49	2,71	84,48	2,10
AD-1143281.1	83,25	5,26	97,82	9,56	87,57	5,49	95,78	5,34
AD-1143282.1	62,39	5,01	70,93	12,74	77,38	0,93	92,25	3,23
AD-1143283.1	74,72	3,35	81,27	5,49	92,84	2,43	100,14	3,42
AD-1143284.1	53,26	1,19	63,20	4,02	83,55	3,21	95,11	4,68

AD-960064.3	35,24	4,68	45,96	3,22	73,26	3,33	88,25	3,26
AD-1143285.1	26,79	2,81	34,47	4,00	77,33	6,80	86,04	9,70
AD-1143286.1	19,35	3,41	29,77	4,83	67,58	14,28	88,54	12,85
AD-1143287.1	36,62	2,41	40,55	10,58	64,21	2,67	88,54	12,76
AD-1143288.1	45,07	9,60	50,93	11,36	74,56	9,65	87,44	7,30
AD-1143289.1	18,55	4,13	26,32	5,27	59,92	6,61	85,97	12,38
AD-1143290.1	66,75	2,91	75,76	4,76	89,92	10,03	103,24	6,45
AD-1143291.1	61,61	1,41	74,92	7,37	96,58	6,23	92,67	4,65
AD-1143292.1	103,71	13,87	96,00	6,82	102,08	18,11	89,10	2,78
AD-1143293.1	64,75	7,70	70,52	5,16	82,76	2,30	88,53	6,30
AD-1143294.1	66,74	10,80	69,22	11,38	80,55	4,13	100,67	14,77
AD-1143295.1	62,66	9,65	62,74	10,64	89,92	20,11	99,75	17,24
AD-1143296.1	68,47	8,32	74,41	5,35	89,72	15,96	102,45	15,29
AD-960096.3	62,06	9,14	62,82	3,97	73,10	3,78	98,71	13,86
AD-1143297.1	63,46	2,13	64,77	0,99	94,66	15,45	87,45	1,11
AD-1143298.1	36,30	4,11	45,39	2,87	77,72	6,66	88,99	6,44
AD-1143299.1	63,33	7,70	60,86	4,26	84,28	16,31	83,82	4,27

AD-1143300.1	31,00	5,52	36,78	5,31	75,23	10,17	89,41	15,09
AD-1143301.1	63,14	13,06	51,90	3,83	83,74	24,11	97,24	14,28
AD-1143302.1	65,92	4,89	72,42	3,43	82,76	5,03	94,16	5,49
AD-1143303.1	72,20	8,33	70,63	2,96	89,97	10,86	101,84	15,93
AD-1143304.1	55,09	2,79	63,03	4,77	78,29	1,36	82,37	3,89
AD-1143305.1	56,12	9,04	58,35	3,55	85,76	6,85	95,38	7,01
AD-1143306.1	95,15	16,35	87,12	1,78	94,75	12,83	93,02	5,19
AD-1143307.1	101,10	14,18	89,16	9,67	98,12	17,65	97,60	10,55
AD-960481.3	76,27	13,63	63,55	6,29	94,32	27,33	96,57	14,20
AD-1143308.1	53,08	3,84	60,34	1,74	73,24	2,55	89,76	1,87
AD-1143309.1	65,24	6,58	68,94	9,69	87,87	12,46	89,04	4,03
AD-1143310.1	60,98	1,83	65,14	2,41	80,93	11,19	86,62	7,35
AD-1143311.1	61,07	0,91	61,76	3,10	91,14	13,28	87,45	1,73
AD-1143312.1	61,85	14,18	53,82	1,28	85,58	8,53	83,02	5,64
AD-1143313.1	79,09	10,91	68,96	8,44	114,58	9,72	84,57	5,14
AD-1143314.1	65,98	14,04	54,39	4,13	97,29	9,49	85,95	15,06
AD-1143315.1	69,73	9,31	56,52	4,43	89,23	19,66	87,97	11,47

AD-1143316.1	37,58	9,74	45,48	4,36	67,15	13,63	86,39	8,46
AD-1143317.1	75,31	5,07	77,89	3,77	79,47	3,23	89,32	2,95
AD-1143318.1	88,04	2,18	85,20	2,80	84,34	4,84	92,15	3,21
AD-1143319.1	78,11	1,03	78,66	1,90	85,48	3,98	87,83	4,39
AD-1143320.1	72,96	4,16	76,75	5,12	83,72	3,86	86,10	1,86
AD-1143321.1	88,56	4,22	87,05	4,63	92,98	16,13	86,86	2,20
AD-1143322.1	96,56	8,01	87,69	5,49	94,48	14,95	90,38	1,88

Таблица 17. Скрининг для АРОСЗ с однократной дозой в клетках НерЗВ

Название дуплекса	50 нМ		10 нМ		1 нМ		0,1 нМ	
	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD
AD-80794.10	5,7	1,1	9,95	0,48	32,69	7,14	64,32	3,18
AD-1143240.1	7,1	1,2	15,92	1,88	38,52	6,25	69,61	5,09
AD-1143241.1	5,7	0,4	10,24	0,34	25,95	2,96	57,20	3,42
AD-1143242.1	6,4	0,9	13,22	1,13	34,61	3,94	61,90	6,43
AD-1143243.1	3,6	1,2	4,93	1,44	11,97	2,19	41,16	3,87
AD-1143244.1	6,1	0,6	14,76	2,30	35,03	5,30	63,06	1,15
AD-1143245.1	3,2	1,0	4,79	0,38	13,05	3,50	35,33	4,64
AD-1143246.1	23,5	2,7	48,43	3,38	51,77	11,43	62,50	8,17
AD-1143247.1	8,2	1,5	15,58	1,25	33,36	3,62	67,35	1,28
AD-1143248.1	30,0	7,8	42,16	4,87	71,78	8,67	90,87	8,70
AD-1143249.1	6,7	1,3	10,12	1,10	30,61	2,16	73,82	12,68
AD-960030.3	6,3	1,2	10,86	0,88	33,81	1,58	78,29	7,19
AD-1143250.1	7,3	2,6	11,13	3,32	38,58	5,25	74,13	15,33
AD-1143251.1	5,7	0,4	11,28	2,82	26,55	4,13	73,77	9,73
AD-1143252.1	3,6	0,8	7,27	1,30	14,89	2,35	60,85	12,26
AD-1143253.1	3,7	0,9	9,57	2,15	24,55	4,12	66,79	6,79
AD-1143254.1	3,4	0,7	5,32	2,07	14,73	2,96	53,26	5,75

AD-1143255.1	4,6	1,3	5,67	1,06	21,00	4,11	71,94	13,73
AD-1143256.1	3,3	0,6	4,51	0,83	11,84	1,22	44,47	5,74
AD-1143257.1	42,1	5,6	66,28	4,64	77,50	16,10	85,21	5,60
AD-1143258.1	14,8	2,8	30,73	2,64	50,53	2,24	76,78	4,31
AD-1143259.1	39,3	10,8	62,34	10,95	58,31	9,70	92,23	23,63
AD-1143260.1	10,3	4,1	27,71	4,89	46,07	6,70	76,35	6,59
AD-960031.3	4,1	0,5	6,33	1,49	13,71	3,98	52,14	2,03
AD-1143261.1	30,0	7,0	45,40	7,52	76,11	11,73	96,35	13,51
AD-1143262.1	8,7	0,6	12,67	2,42	33,93	4,28	80,72	10,76
AD-1143263.1	7,0	1,9	8,59	1,53	24,97	4,76	70,04	3,98
AD-1143264.1	10,5	2,6	15,57	2,68	36,20	4,20	69,58	4,36
AD-1143265.1	7,0	1,1	14,90	4,74	29,19	7,67	68,07	6,60
AD-1143266.1	7,4	3,6	14,06	3,79	36,54	10,79	69,23	16,16
AD-1143267.1	6,4	2,8	10,39	4,74	27,85	9,35	77,07	14,58
AD-1143268.1	18,4	5,3	30,21	7,20	64,69	15,99	87,24	6,39
AD-1143269.1	12,7	1,0	23,02	5,11	48,27	3,18	89,49	12,32
AD-1143270.1	11,9	1,8	23,75	6,38	48,58	8,61	85,30	6,72
AD-1143271.1	15,6	2,4	22,50	4,14	51,50	15,12	75,61	4,59
AD-1143272.1	13,6	0,7	23,31	5,30	48,00	6,30	79,88	3,87
AD-1143273.1	6,5	1,7	10,62	2,32	30,43	12,95	59,42	3,85
AD-1143274.1	5,9	1,9	9,74	2,72	20,44	5,25	59,55	8,94
AD-960062.3	6,0	1,1	14,90	3,08	38,29	5,48	78,23	11,31
AD-1143275.1	21,9	20,0	20,20	4,71	58,80	19,25	87,53	3,36
AD-1143276.1	13,5	4,1	17,22	1,37	45,40	5,79	81,50	8,12
AD-1143277.1	11,2	2,2	17,51	2,37	42,03	6,65	81,04	9,28
AD-1143278.1	5,0	1,4	6,79	0,82	15,99	2,77	58,30	14,40
AD-1143279.1	7,6	2,0	11,26	1,68	32,37	4,56	62,14	3,43
AD-1143280.1	4,8	3,0	5,89	0,52	13,05	3,98	41,79	5,31
AD-1143281.1	45,7	5,9	59,48	7,68	70,38	3,75	77,63	7,52
AD-1143282.1	16,3	2,4	24,29	6,42	56,76	5,55	80,93	3,65
AD-1143283.1	25,8	1,5	44,82	11,38	72,55	14,90	94,36	5,31
AD-1143284.1	10,4	2,8	16,97	2,34	42,91	5,08	79,91	4,59
AD-960064.3	4,2	0,6	7,37	3,78	19,17	4,36	49,10	5,66
AD-1143285.1	5,4	1,4	7,86	1,22	17,89	1,37	54,59	14,15

AD-1143286.1	4,0	1,4	5,02	1,00	14,71	4,90	39,71	1,47
AD-1143287.1	4,7	1,9	5,59	2,40	15,79	4,39	48,62	13,52
AD-1143288.1	6,7	1,6	6,50	0,81	21,80	8,36	64,64	18,78
AD-1143289.1	4,8	0,7	7,27	1,89	19,96	2,45	72,86	11,19
AD-1143290.1	13,1	3,0	21,10	3,85	56,96	2,68	84,38	17,46
AD-1143291.1	11,3	0,7	20,46	3,83	57,48	7,36	83,09	13,09
AD-1143292.1	73,7	6,0	76,74	12,40	85,93	13,10	85,38	4,81
AD-1143293.1	9,3	1,3	20,27	4,53	42,95	5,74	73,75	2,06
AD-1143294.1	12,1	1,4	25,36	7,70	49,62	7,18	86,00	5,63
AD-1143295.1	8,3	2,3	12,41	2,06	36,35	1,40	58,61	9,02
AD-1143296.1	9,8	1,2	18,77	6,23	47,68	14,59	85,91	4,26
AD-960096.3	8,5	1,9	10,64	2,21	28,32	4,33	69,12	1,44
AD-1143297.1	8,7	0,7	14,90	2,16	51,05	16,48	90,58	15,04
AD-1143298.1	4,9	0,3	6,62	0,97	18,55	4,52	65,95	17,11
AD-1143299.1	5,5	1,2	7,73	1,65	22,91	1,45	59,57	8,18
AD-1143300.1	4,9	1,2	8,31	3,19	22,19	11,16	52,43	7,83
AD-1143301.1	6,3	0,9	10,75	1,98	28,49	7,31	70,30	10,58
AD-1143302.1	7,9	1,5	11,19	3,20	38,83	14,98	87,33	15,21
AD-1143303.1	8,6	1,3	12,40	2,65	48,46	1,79	98,13	17,19
AD-1143304.1	9,7	2,5	11,07	1,79	35,65	3,16	93,11	17,36
AD-1143305.1	9,1	4,3	10,51	2,17	36,75	4,73	75,09	5,82
AD-1143306.1	41,1	6,7	58,50	7,88	85,88	16,83	85,51	2,76
AD-1143307.1	37,6	4,0	48,21	1,96	90,07	19,23	99,33	19,17
AD-960481.3	14,3	3,0	16,70	1,93	24,93	4,18	58,59	12,39
AD-1143308.1	10,4	0,9	11,43	0,75	20,45	6,28	55,52	9,39
AD-1143309.1	15,5	1,4	16,40	2,68	34,69	2,64	67,90	12,70
AD-1143310.1	13,8	1,0	15,28	1,15	30,24	5,65	68,82	8,91
AD-1143311.1	15,4	2,4	17,79	2,39	34,59	7,22	65,86	10,52
AD-1143312.1	14,5	1,6	15,72	3,57	31,73	11,40	57,08	6,92
AD-1143313.1	20,8	3,4	27,95	14,33	42,27	7,42	75,75	8,10
AD-1143314.1	17,1	2,1	19,52	2,15	37,72	8,99	72,95	22,77
AD-1143315.1	12,7	3,7	17,40	3,53	31,01	8,81	76,52	15,22
AD-1143316.1	11,8	0,8	14,83	1,86	30,60	5,14	67,90	8,60
AD-1143317.1	18,8	2,0	22,92	3,28	44,93	5,70	70,55	6,43

AD-1143318.1	35,6	2,2	34,82	2,89	59,98	8,35	75,30	3,45
AD-1143319.1	15,9	1,3	21,27	3,79	41,72	6,38	70,74	12,44
AD-1143320.1	23,8	1,4	33,05	5,65	59,79	7,71	68,64	11,31
AD-1143321.1	52,4	6,7	60,14	7,06	73,20	5,57	71,89	1,25
AD-1143322.1	51,0	3,8	62,29	7,70	67,07	7,38	78,84	15,84

Представляющие интерес дуплексы, идентифицированные в ходе вышеуказанных исследований SAR *in vitro*, оценивались *in vivo*. В частности, в день -14 перед дозой мышью дикого типа (C57BL/6) трансдуцировали ретроорбитальным введением  $2 \times 10^{10}$  вирусных частиц вектора аденоассоциированного вируса 8 (AAV8), кодирующего человеческий АРОС3. В частности, мышам вводили AAV8, кодирующий мРНК АРОС3 человека, обозначаемый как AAV8-TBG-PI-АРОС3.

В день 0 группам из трех мышей подкожно вводили однократную дозу 3 мг/кг представляющих интерес агентов или контроль PBS. В таблице 18 представлены группы лечения, а в таблице 19 представлены представляющие интерес дуплексы. На день 7 или день 14 после введения дозы животных умерщвляли, образцы печени собирали и быстро замораживали в жидком азоте. мРНК печени экстрагировали и анализировали методом количественной ПЦР в реальном времени.

Уровни мРНК АРОС3 человека сравнивали с геном домашнего хозяйства, GAPDH. Затем значения нормализовали к среднему значению для контрольной группы с носителем PBS. Данные были выражены в процентах от исходного значения и представлены как среднее значение плюс стандартное отклонение. Результаты, перечисленные в таблице 20 и показанные на фиг. 3, демонстрируют, что протестированные репрезентативные дуплексные агенты эффективно снижают уровень матричной РНК человека АРОС3 *in vivo*.

Таблица 18. Группы лечения

Группа #	Животное #	Лечение	Доза	временная точка
1	1	PBS	n/a	D0, D7, D14
	2			
	3			
2	4	не получавший лечения (только AAV)	n/a	
	5			
	6			
3	7	AD-80794 (Benchmark)	3 мг/кг	
	8			
	9			
4	10	AD-960030		
	11			
	12			

5	13	AD-1143243
	14	
	15	
6	16	AD-1143245
	17	
	18	
7	19	AD-1143247
	20	
	21	
8	22	AD-1143249
	23	
	24	
9	25	AD-1143256
	26	
	27	
10	28	AD-1143289
	29	
	30	
11	31	AD-1143278
	32	
	33	
12	34	AD-1143287
	35	
	36	
13	37	AD-1143295
	38	
	39	
14	40	AD-1143299
	41	
	42	
15	43	AD-1143302
	44	
	45	
16	46	AD-1143305

	47		
	48		
17	49	AD-1183925	
	50		
	51		
18	52	AD-1183926	
	53		
	54		
19	55	AD-1019001 (Arrowhead)	
	56		
	57		
20	58	AD-58295	
	59		
	60		

Таблица 19. Интересующие дуплексы

ID Дуплекса	Диапазон в NM-000040.3
AD-960030	429-451
AD-1143243	432-452
AD-1143245	432-452
AD-1143247	430-452
AD-1143249	430-452
AD-1143256	431-451
AD-1143260	429-451
AD-1143278	430-452
AD-1143287	433-455
AD-1143295	433-455
AD-1143299	504-526
AD-1143302	504-526
AD-1143305	506-526
AD-1183925	510-532
AD-1183926	512-532
AD-58295	Отрицательный контроль

Таблица 20.

Дуплекс	% оставшихся мРНК	SD
---------	-------------------	----

PBS	102,64	27,23
AD-80794.11	19,86	9,05
AD-960030.4	16,99	4,69
AD-1143243.2	25,98	5,12
AD-1143245.2	39,13	14,55
AD-1143247.2	41,77	56,07
AD-1143249.2	31,91	32,10
AD-1143256.2	15,43	7,40
AD-1143289.2	8,27	1,73
AD-1143278.2	54,31	12,95
AD-1143287.2	4,00	4,94
AD-1143295.2	24,85	18,86
AD-1143299.2	23,37	5,80
AD-1143302.2	57,80	27,34
AD-1143305.2	38,33	23,55
AD-1183925.2	31,91	5,66
AD-1183926.2	22,87	6,44
AD-1019001.2	99,93	32,38
AD-58295.5	84,59	43,87

#### ЭКВИВАЛЕНТЫ

Специалистам в данной области будет понятно, или они могут устанавливать использованием только общепринятого экспериментирования многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления и способов, описываемых в настоящем описании. Предполагают, что такие эквиваленты входят в объем следующей ниже формулы изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Агент двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 (АРОС3) в клетке, где указанный агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где антисмысловая цепь содержит область комплементарности мРНК, кодирующей аполипопротеин С3, и, где область комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из таблиц 2-5, 14 и 15.

2. Агент двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 (АРОС3) в клетке, где указанный агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида от любой из нуклеотидной последовательности нуклеотидов 232-254; 233-255; 238-260; 239-261; 242-264; 243-265; 244-266; 264-286; 268-290; 426-448; 431-453; 432-454; 433-455; 435-457; 436-458; 499-521; 500-522; 503-525; 504-526; 507-529; 510-532; или 511-533 SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

3. Агент дцРНК по п. 1 или 2, где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-959917.1; AD-959918.1; AD-960096.1; AD-960064.1; AD-959914.1; AD-959941.1; AD-960031.1; AD-960063.1; AD-960293.1; AD-960288.1; AD-960445.1; AD-960292.1; AD-960475.1; AD-960442.1; AD-960470.1; AD-960436.1; AD-960446.1; AD-960474.1; AD-960294.1; AD-960471.1; AD-960314.1; AD-960443.1; AD-960282.1; AD-960283.1; AD-80794.7; AD-960478.1; AD-960481.1; и AD-960482.1.

4. Агент двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 (АРОС3) в клетке, где указанный агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида от любой из нуклеотидной последовательности нуклеотидов 235-257; 238-260; 242-264; 243-265; 244-266; 426-448; 430-450; 431-453; 432-454; 433-455; 435-457; 436-458; 499-521; 503-525; и 504-526 SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

5. Агент дцРНК по п. 1 или 2, где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-959917.1; AD-960064.1; AD-960031.1; AD-960063.1; AD-960293.1; AD-960288.1; AD-960445.1; AD-960292.1; AD-960475.1; AD-960442.1; AD-960470.1; AD-

960436.1; AD-960446.1; AD-960474.1; AD-960294.1; AD-960443.1; AD-80794.7; и AD-959910.1.

6. Агент двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 (АРОС3) в клетке, где указанный агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида от любой из нуклеотидной последовательности нуклеотидов 232-254; 239-261; 242-264; 244-266; 258-280; 264-286; 268-290, 429-451; 430-450; 430-452; 433-455; 434-456; 435-457; 500-522; 503-525; 507-529; и 510-532 SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

7. Агент дцРНК по п. 1 или 2, где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем три нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-80794.8; AD-959907.2; AD-959914.2; AD-959916.2; AD-959932.2; AD-960314.2; AD-959941.2; AD-960030.2; AD-960062.2; AD-960064.2; AD-960065.2; AD-960066.2; AD-960294.2; AD-960471.2; AD-960474.2; AD-960478.2; и AD-960481.2.

8. Агент двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 (АРОС3) в клетке, где указанный агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида от любой из нуклеотидной последовательности нуклеотидов 429-451; 430-452; 431-451; 432-452; 433-455; 504-526; и 506-526 SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

9. Агент дцРНК по п. 1 или 2, где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из 960064.2; AD-960065.2; AD-960066.2; AD-960294.2; AD-960471.2; AD-960474.2; AD-960478.2; и AD-960481.2.

10. Агент двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке, где агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из нуклеотидной последовательности нуклеотидов 429-455 или 504-532 нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

11. Агент двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке, где агент дцРНК содержит смысловую цепь и

антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из нуклеотидной последовательности нуклеотидов 429-451; 430-452; 431-451; 432-452; 433-455; 434-452; 504-526; и 506-526 нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

12. Агент дцРНК по п. 10 или 11, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности нуклеотидов 434-452 SEQ ID NO:1.

13. Агент дцРНК по любому из п.п. 10-12, где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-960030; AD-960064; AD-1143243; AD-1143245; AD-1143247; AD-1143249; AD-1143256; AD-1143260; AD-1143278; AD-1143287; AD-1143295; AD-1143299; AD-1143302; и AD-1143305.

14. Агент дцРНК по любому из п.п. 10-13, где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности антисмысловой цепи дуплекса AD-1143243.

15. Агент дцРНК по любому из п.п. 10-13, где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности антисмысловой цепи дуплекса AD-1143278 или AD-960064.

16. Агент дцРНК по любому из п.п. 1-15, где агент дцРНК содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

17. Агент дцРНК по любому из п.п. 1-16, где по существу все нуклеотиды смысловой цепи; по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию; или по существу все нуклеотиды смысловой цепи и по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

18. Агент дцРНК по любому из п.п. 1-17, где все нуклеотиды смысловой цепи содержат модификацию; все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию; или все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

19. Агент дцРНК по любому из п.п. 16-18, где по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезокси-нуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно-ограниченного нуклеотида, затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-

модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидроксил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфоротиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата, термодестабилизирующего нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA) и 2-О-(N-метилацетамид)-модифицированного нуклеотида; и их комбинации.

20. Агент дцРНК по любому из п.п. 16-18, где модификации нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-алкила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-фтора, 2'-дезоксид, 2'-гидроксила и гликоля; и их комбинации.

21. Агент дцРНК по любому из п.п. 16-18, где по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезокси-нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA) и винил-фосфонатного нуклеотида; и их комбинации.

22. Агент дцРНК по любому из п.п. 16-18, где по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезокси-нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида и 2'-фтор-модифицированного нуклеотида; и их комбинации.

23. Агент дцРНК по любому из п.п. 16-18, где по меньшей мере одна из модификаций нуклеотидов представляет собой термически дестабилизирующую модификацию нуклеотида.

24. Агент дцРНК по п. 23, где термически дестабилизирующая модификация нуклеотида выбрана из группы, состоящей из модификации с удаленным азотистым основанием; несоответствия с противоположным нуклеотидом в дуплексе; и дестабилизирующей модификации сахара, 2'-дезоксид-модификации, ациклического нуклеотида, незапертой нуклеиновой кислоты (UNA) и глицериновой нуклеиновой кислоты (GNA).

25. Агент дцРНК по любому из п.п. 1-24, где длина двухцепочечной области составляет 19-30 пар нуклеотидов.

26. Агент дцРНК по п. 25, где длина двухцепочечной области составляет 19-25 пар нуклеотидов.

27. Агент дцРНК по п. 25, где длина двухцепочечной области составляет 19-23 пары нуклеотидов.

28. Агент дцРНК по п. 25, где длина двухцепочечной области составляет 23-27 пар нуклеотидов.

29. Агент дцРНК по п. 25, где длина двухцепочечной области составляет 21-23 пары

нуклеотидов.

30. Агент дцРНК по любому из п.п. 1-29, где каждая цепь независимо имеет длину не более 30 нуклеотидов.

31. Агент дцРНК по любому из п.п. 1-30, где длина смысловой цепи равна 21 нуклеотиду, а длина антисмысловой цепи равна 23 нуклеотидам.

32. Агент дцРНК по любому из п.п. 1-31, где область комплементарности имеет длину по меньшей мере 17 нуклеотидов.

33. Агент дцРНК по любому из п.п. 1-32, где область комплементарности имеет длину от 19 до 23 нуклеотидов.

34. Агент дцРНК по любому из п.п. 1-31, где область комплементарности имеет длину 19 нуклеотидов.

35. Агент дцРНК по любому из п.п. 1-34, где по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступающий конец, по меньшей мере, из 1 нуклеотида.

36. Агент дцРНК по любому из п.п. 1-34, где по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

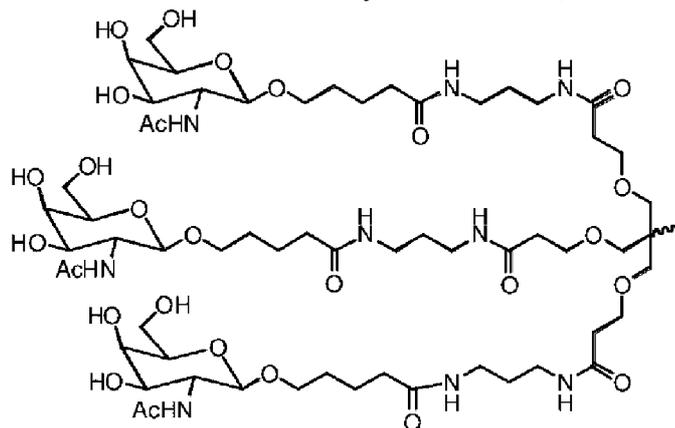
37. Агент дцРНК по любому из п.п. 1-36, дополнительно содержащий лиганд.

38. Агент дцРНК по п. 37, где лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи агента дцРНК.

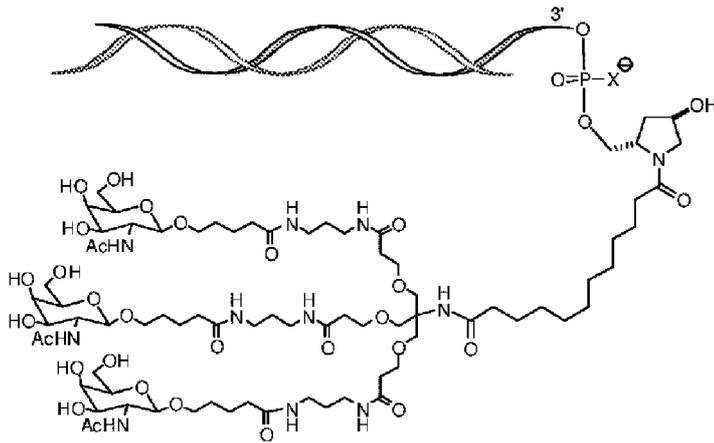
39. Агент дцРНК по п. 37 или 38, где лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

40. Агент дцРНК по любому из п.п. 37-39, где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством одновалентного, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

41. Агент дцРНК по любому из п.п. 37-40, где лиганд представляет собой



42. Агент дцРНК по п. 41, где агент дцРНК конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме



и, где X представляет собой O или S.

43. Агент дцРНК по п. 42, где X представляет собой O.

44. Агент дцРНК по любому из п.п. 1-43, где агент дцРНК дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

45. Агент дцРНК по п. 44, где фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной цепи.

46. Агент дцРНК по п. 45, где цепь представляет собой антисмысловую цепь.

47. Агент дцРНК по п. 45, где цепь представляет собой смысловую цепь.

48. Агент дцРНК по п. 44, где фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи.

49. Агент дцРНК по п. 48, где цепь представляет собой антисмысловую цепь.

50. Агент дцРНК по п. 48, где цепь представляет собой смысловую цепь.

51. Агент дцРНК по п. 44, где фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-, так и на 3'-конце одной цепи.

52. Агент дцРНК по п. 51, где цепь представляет собой антисмысловую цепь.

53. Агент дцРНК по любому из п.п. 1-52, где пара оснований в положении 1 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса представляет собой пару оснований AU.

54. Агент двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке, где агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности CUUAAAAGGGACAGUAUUCUA (SEQ ID NO:13), и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности UAGAAUACUGUCCCUUUUAAGCC (SEQ ID NO:14),

где по существу все нуклеотиды смысловой цепи и по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации, 2'-фтор-модификации и дезокси-модификации,

где как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь независимо дополнительно

содержат по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь, и

где по меньшей мере одна цепь конъюгирована с лигандом.

55. Агент дцРНК по п. 54, где смысловая цепь содержит 2-6 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов.

56. Агент дцРНК по п. 54 или 55, где антисмысловая цепь содержит не более 4 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов.

57. Агент дцРНК по любому из п.п. 54-56 где антисмысловая цепь содержит 1-5 дезокси-модифицированных нуклеотидов.

58. Агент двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии апополипротеина С3 в клетке,

где агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности нуклеотидов 429-456 нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2,

где все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации, 2'-фтор-модификации и дезокси-модификации,

где как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь независимо дополнительно содержат по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь, и где по меньшей мере одна цепь конъюгирована с лигандом.

59. Агент дцРНК по п. 58, где смысловая цепь содержит 2-6 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов.

60. Агент дцРНК по п. 58 или 59, где смысловая цепь содержит 4 2'-фтор-модифицированных нуклеотида.

61. Агент дцРНК по любому из п.п. 58-60, где антисмысловая цепь содержит 2-4 2'-фтор-модифицированных нуклеотида.

62. Агент дцРНК по п. 61, где антисмысловая цепь содержит 2 2'-фтор-модифицированных нуклеотида.

63. Агент дцРНК по любому из п.п. 58-62, где антисмысловая цепь содержит 1-5 2'-дезокси-модифицированных нуклеотидов.

64. Агент дцРНК по п. 63, где антисмысловая цепь содержит 3 2'-дезокси-модифицированных нуклеотида.

65. Агент дцРНК по любому из п.п. 58-64, где смысловая цепь содержит 4 2'-фтор-модифицированных нуклеотида в нуклеотидах 7 и 9-11, отсчет от 5'-конца, и антисмысловая цепь содержит 2 2'-фтор-модифицированных нуклеотида в нуклеотидах 14 и 16, отсчет от 5'-конца, и 3 2'-дезокси-модифицированных нуклеотида в нуклеотидах 2, 5

и 7, отсчет от 5'-конца.

66. Агент дцРНК по любому из п.п. 58-65, где смысловая цепь содержит две фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи на 5'-конце.

67. Агент дцРНК по любому из п.п. 58-66, где антисмысловая цепь содержит две фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи как на 5'-, так и на 3'-конце.

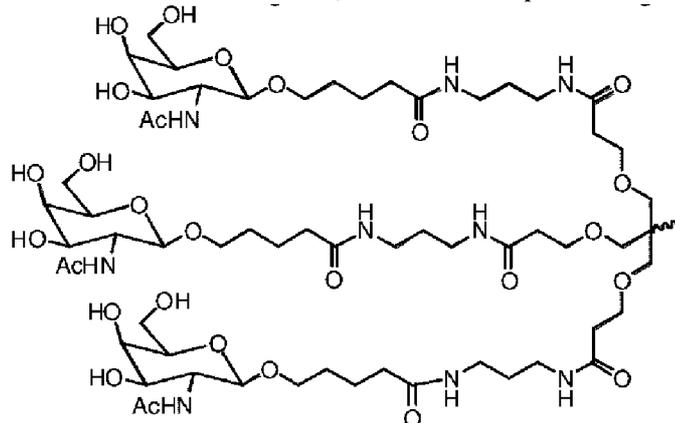
68. Агент дцРНК по любому из п.п. 58-67, где смысловая цепь содержит две фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и антисмысловая цепь содержит две фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи как на 5'-, так и на 3'-конце.

69. Агент дцРНК по любому из п.п. 58-68, где лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи.

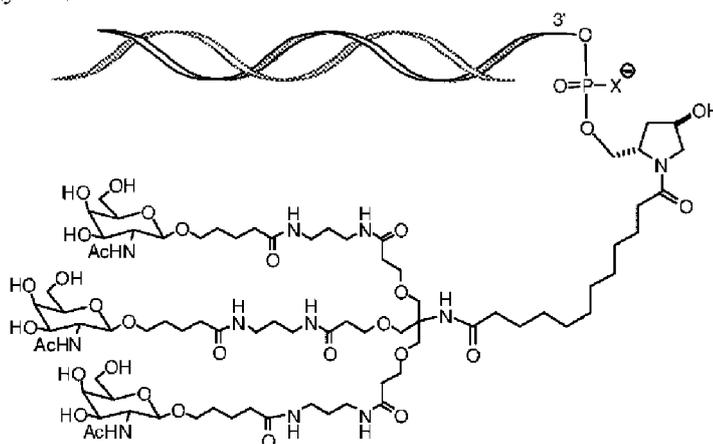
70. Агент дцРНК по любому из п.п. 58-69, где лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

71. Агент дцРНК по п. 70, где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством одновалентного, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

72. Агент дцРНК по п. 71, где лиганд представляет собой



73. Агент дцРНК по п. 72, где агент дцРНК конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме



и, где X представляет собой O.

74. Агент двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке,

где агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

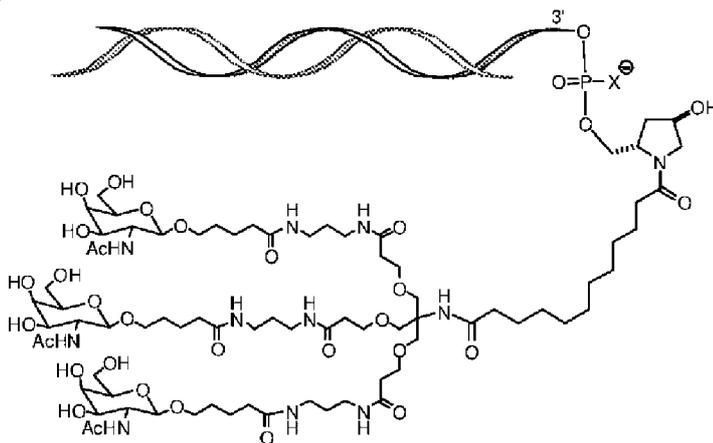
где смысловая цепь отличается не более чем на 3 модифицированных нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'- csusuaaaAfgGfGfAfcaguaauucua-3' (SEQ ID NO:15) и, где антисмысловая цепь отличается не более чем на 3 модифицированных нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'- usdAsgadAudAcuguccCfuUfuaaagscsc -3' (SEQ ID NO:16),

где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) A, G, C и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U, соответственно; dA представляет собой 2'-дезоксиаденозин-3'-фосфатный нуклеотид; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

75. Агент дцРНК по п. 74, где смысловая цепь отличается не более чем на 2 модифицированных нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'- csusuaaaAfgGfGfAfcaguaauucua-3' (SEQ ID NO:15) и, где антисмысловая цепь отличается не более чем на 2 модифицированных нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'- usdAsgadAudAcuguccCfuUfuaaagscsc -3' (SEQ ID NO:16).

76. Агент дцРНК по п. 74, где смысловая цепь отличается не более чем на 1 модифицированный нуклеотид от нуклеотидной последовательности 5'- csusuaaaAfgGfGfAfcaguaauucua-3' (SEQ ID NO:15) и, где антисмысловая цепь отличается не более чем на 1 модифицированный нуклеотид от нуклеотидной последовательности 5'- usdAsgadAudAcuguccCfuUfuaaagscsc -3' (SEQ ID NO:16).

77. Агент дцРНК по п. 74, где агент дцРНК конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме



и, где X представляет собой O.

78. Агент двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке,

где агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-csusuaaaAfgGfGfAfcaguaauucua-3' (SEQ ID NO:15) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-usdAsgadAudAcuguccCfuUfuaaagscsc -3' (SEQ ID NO:16),

где а, g, с и и представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор А, G, С и U, соответственно; dA представляет собой 2'-дезоксиаденозин-3'-фосфатный нуклеотид; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

79. Агент двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке,

где агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-csusuaaaAfgGfGfAfcaguaauucuaL96-3' (SEQ ID NO:17) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-usdAsgadAudAcuguccCfuUfuaaagscsc -3' (SEQ ID NO:16),

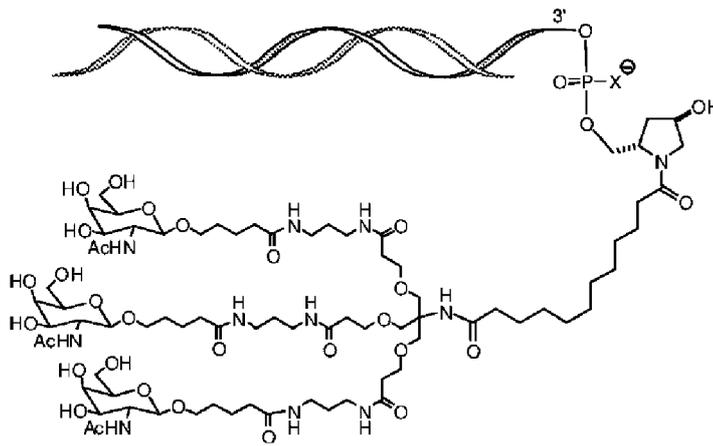
где а, g, с и и представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор А, G, С и U, соответственно; dA представляет собой 2'-дезоксиаденозин-3'-фосфатный нуклеотид; s представляет собой фосфоротиоатную связь, и L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипролинол.

80. Агент двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке,

где агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-csusuaaaAfgGfGfAfcaguaauucua-3' (SEQ ID NO:15) и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-usdAsgadAudAcuguccCfuUfuaaagscsc -3' (SEQ ID NO:16),

где а, g, с и и представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор А, G, С и U, соответственно; dA представляет собой 2'-дезоксиаденозин-3'-фосфатный нуклеотид; и s представляет собой фосфоротиоатную связь; и где 3'-конец смысловой цепи конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме:



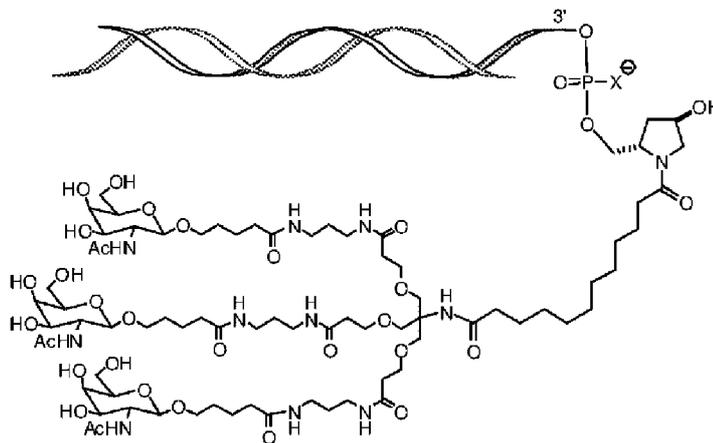
, где X представляет собой O.

81. Агент двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии аполипопротеина С3 в клетке,

где агент дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

где смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-csusuaaaAfgGfGfAfcaguaaucua-3' (SEQ ID NO:15) и антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-usdAsgadAudAciguccCfuUfuaaagscsc -3' (SEQ ID NO:16),

где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) A, G, C и U, соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор A, G, C и U, соответственно; dA представляет собой 2'-дезоксиаденозин-3'-фосфатный нуклеотид; и s представляет собой фосфоротиоатную связь; и где 3'-конец смысловой цепи конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме:



, где X представляет собой

O.

82. Клетка, содержащая агент дцРНК по любому из п.п. 1-81.

83. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена, кодирующего аполипопротеин С3 (АРОС3), содержащая агент дцРНК по любому из п.п. 1-81.

84. Фармацевтическая композиция по п. 83, где агент дцРНК находится в незабуферном растворе.

85. Фармацевтическая композиция по п. 84, где незабуференный раствор представляет собой физиологический раствор или воду.

86. Фармацевтическая композиция по п. 83, где указанный агент дцРНК находится в буферном растворе.

87. Фармацевтическая композиция по п. 86, где буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию.

88. Фармацевтическая композиция по п. 87, где буферный раствор представляет собой забуференный фосфатом солевой раствор (PBS).

89. Способ ингибирования экспрессии гена аполипопротеина С3 (АРОС3) в клетке, включающий приведение клетки в контакт с агентом дцРНК по любому из п.п. 1-81 или фармацевтической композицией по любому из п.п. 83-88, таким образом, ингибируя экспрессию гена АРОС3 в клетке.

90. Способ по п. 89, где клетка находится внутри субъекта.

91. Способ по п. 90, где субъект представляет собой человека.

92. Способ по п. 91, где субъект страдает расстройством, ассоциированным с аполипопротеином С3.

93. Способ по п. 92, где расстройство, ассоциированное с аполипопротеином С3, выбрано из группы, состоящей из гипертриглицеридемии, неалкогольной жировой болезни печени, неалкогольного стеатогепатита, синдрома поликистозных яичников, заболевания почек, ожирения, сахарного диабета 2 типа (инсулинорезистентность), гипертензии, атеросклероза и панкреатита.

94. Способ по любому из п.п. 89-93, где контактирование клетки с агентом дцРНК ингибирует экспрессию аполипопротеина С3 по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

95. Способ по любому из п.п. 89-94, где ингибирование экспрессии аполипопротеина С3 снижает уровень белка аполипопротеина С3 в сыворотке субъекта по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

96. Способ лечения субъекта, страдающего заболеванием, для которого полезно снижение экспрессии аполипопротеина С3, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества агента дцРНК по любому из п.п. 1-81 или фармацевтической композиции по любому из п.п. 83-88, таким образом осуществляя лечение субъекта, страдающего расстройством, для которого полезно снижение экспрессии аполипопротеина С3.

97. Способ предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием, для которого полезно снижение экспрессии аполипопротеина С3, включающий введение субъекту профилактически эффективного количества агента дцРНК по любому из п.п. 1-81 или фармацевтической композиции по любому из п.п. 83-88, предотвращая, таким образом, по меньшей мере один симптом у субъекта, страдающего расстройством, для которого полезно снижение экспрессии аполипопротеина С3.

98. Способ по п. 96 или 97, где расстройство представляет собой расстройство,

ассоциированное с аполипопротеином С3.

99. Способ по п. 98, где расстройство, ассоциированное с аполипопротеином С3, выбрано из группы, состоящей из гипертриглицеридемии, неалкогольной жировой болезни печени, неалкогольного стеатогепатита, синдрома поликистозных яичников, заболевания почек, ожирения, сахарного диабета 2 типа (инсулинорезистентность), гипертензии, атеросклероза и панкреатита.

100. Способ по п. 98, где расстройство, ассоциированное с аполипопротеином С3, представляет собой гипертриглицеридемию.

101. Способ по любому из п.п. 96-100, где субъект представляет собой человека.

102. Способ по любому из п.п. 96-101, где введение агента субъекту вызывает ослабление гипертриглицемии и/или уменьшение накопления белка АРОС3.

103. Способ по любому из п.п. 96-102, где агент дцРНК вводят субъекту в дозе от примерно 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг.

104. Способ по любому из п.п. 96-103, где агент дцРНК вводят субъекту подкожно.

105. Способ по любому из п.п. 96-104, дополнительно включающий определение уровня аполипопротеина С3 в образце(образцах) субъекта.

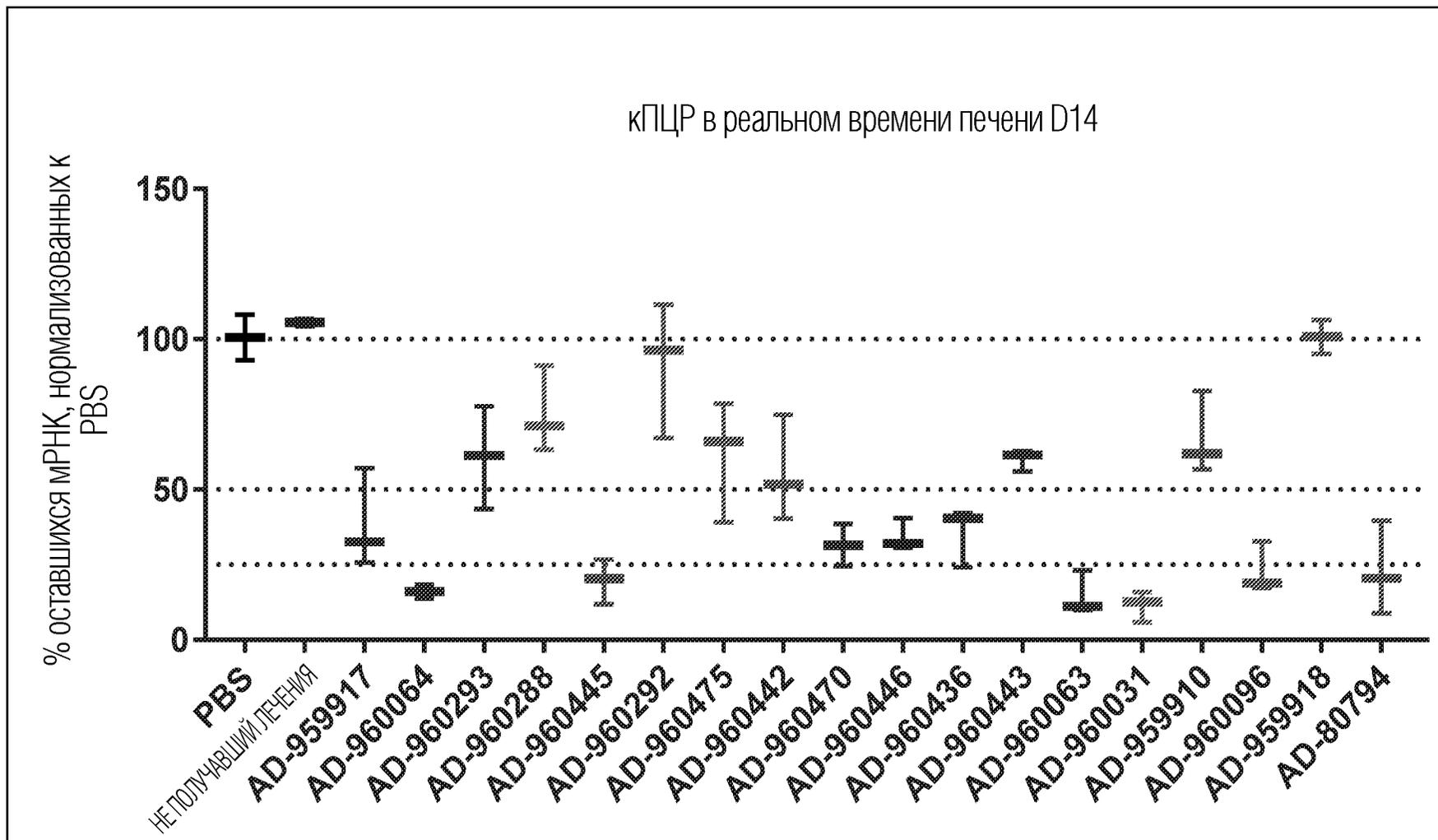
106. Способ по п. 105, где уровень аполипопротеина С3 в образце(образцах) субъекта представляет собой уровень белка аполипопротеина С3 в образце(образцах) крови или сыворотки.

107. Способ по любому из п.п. 96-106, дополнительно включающий введение субъекту дополнительного терапевтического средства для лечения гемолиза.

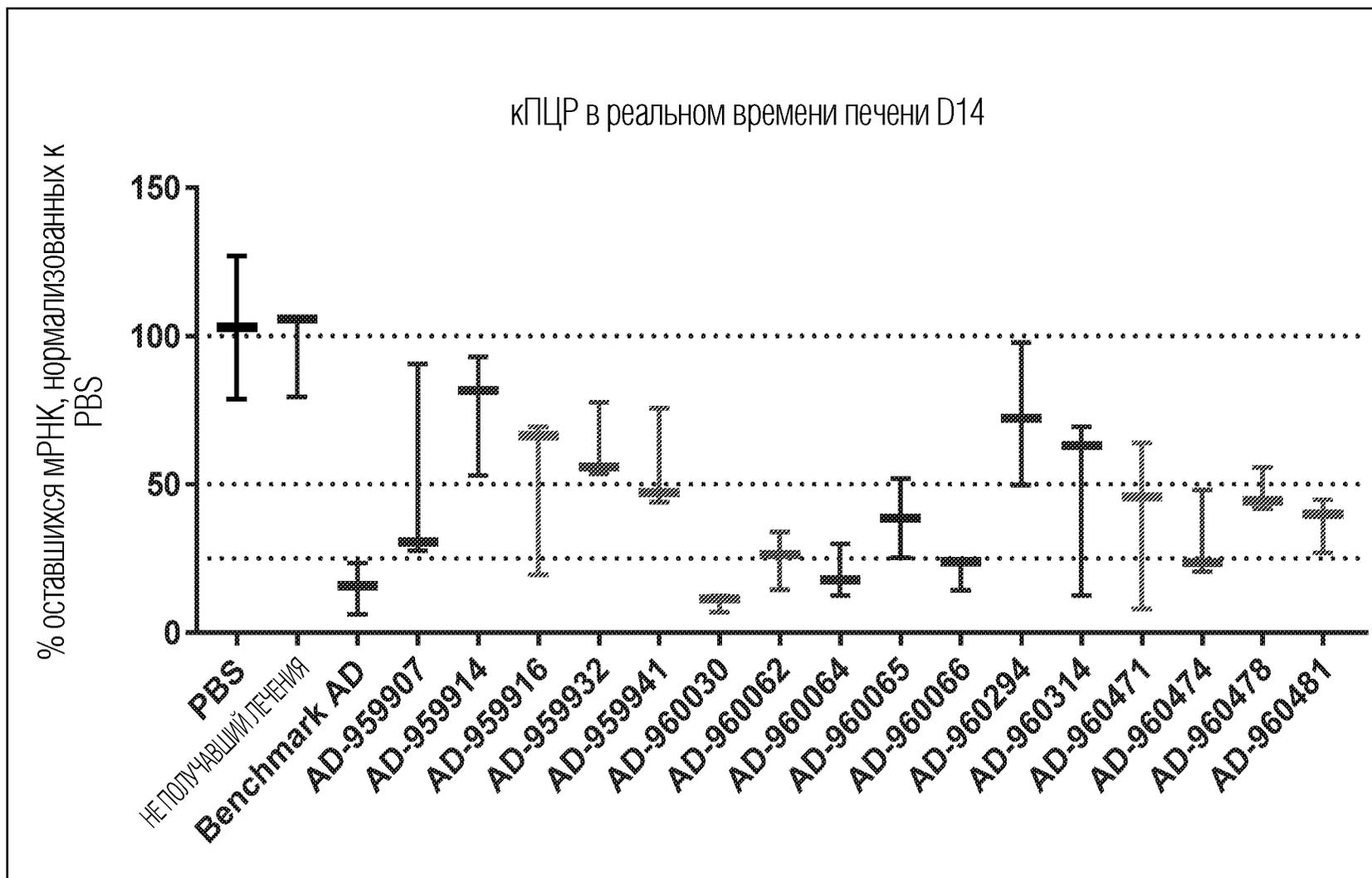
108. Набор, содержащий агент дцРНК по любому из п.п. 1-81 или фармацевтическую композицию по любому из п.п. 83-88.

109. Флакон, содержащий агент дцРНК по любому из п.п. 1-81 или фармацевтическую композицию по любому из п.п. 83-88.

110. Шприц, содержащий агент дцРНК по любому из п.п. 1-81 или фармацевтическую композицию по любому из п.п. 83-88.

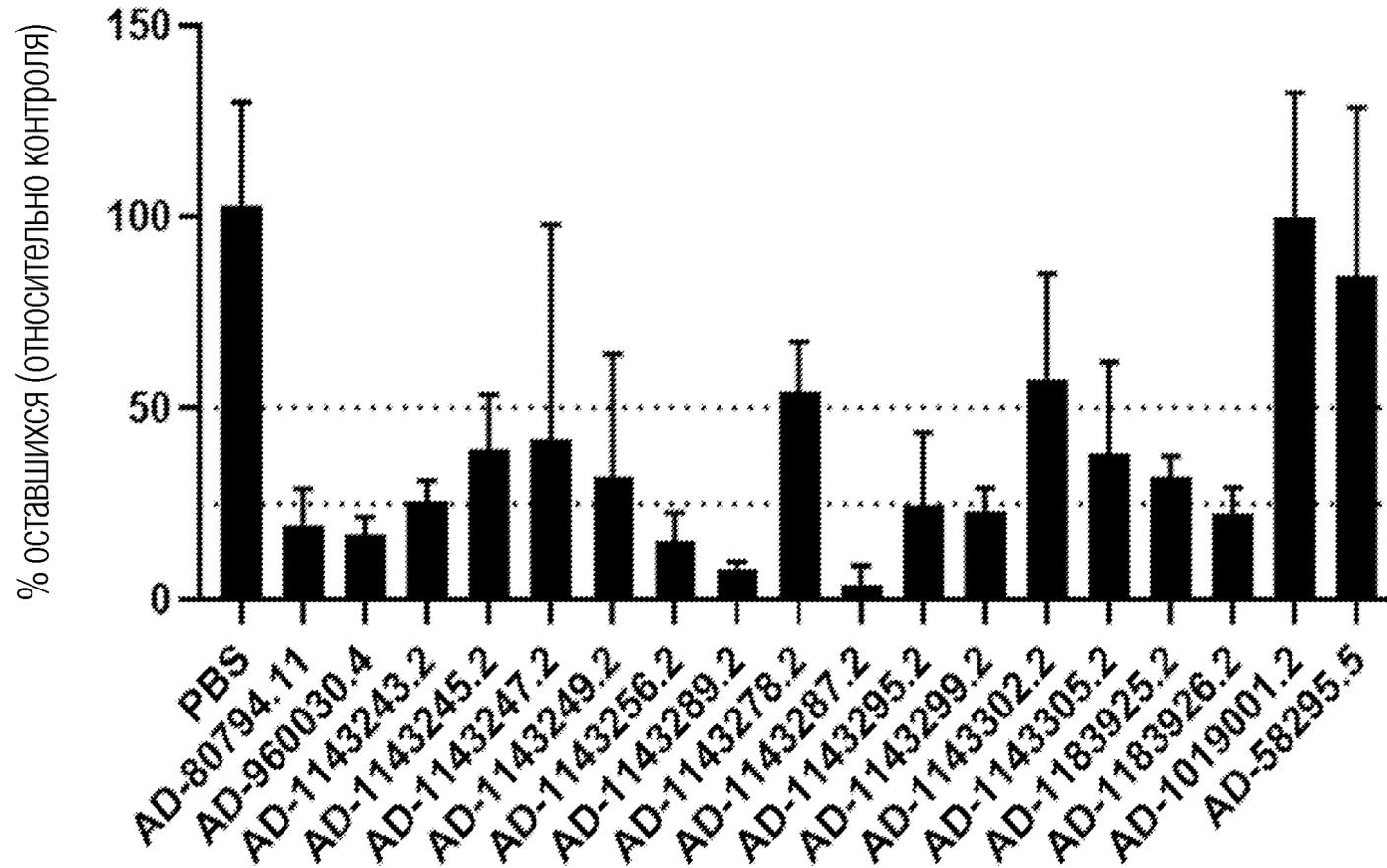


ФИГ. 1



ФИГ. 2

D14 - кПЦР



ФИГ. 3