

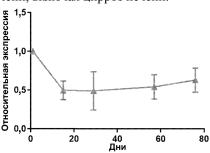
(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

- (43) Дата публикации заявки 2022.12.09
- (22) Дата подачи заявки 2021.03.26

(51) Int. Cl. A61K 31/713 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01) A61P 3/06 (2006.01)

(54) РНКи-АГЕНТЫ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ PNPLA3, ИХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

- (31) 63/000,137
- (32) 2020.03.26
- (33) US
- (86) PCT/US2021/024299
- (87) WO 2021/195467 2021.09.30
- (88) 2021.11.11
- (71) Заявитель: ЭРРОУХЕД ФАРМАСЬЮТИКЛЗ, ИНК. (US)
- (72) Изобретатель: Николас Энтони, Пэй Тао, Сюй Чжао, Шинебек Каси, Дин Чжимин (US)
- (74) Представитель:
 Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
 Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
 А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
 Кузнецова Т.В. (RU)
- (57) Изобретение относится к РНКи-агентам, например двухцепочечным РНКи-агентам, способным ингибировать экспрессию гена, содержащего пататинподобный фосфолипазный домен белка 3 (PNPLA3). Кроме того, описаны фармацевтические композиции, которые включают РНКи-агенты против PNPLA3, и способы их применения. РНКи-агенты против PNPLA3, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированы с нацеливающими лигандами для облегчения доставки в клетки, включая гепатоциты. Доставка РНКи-агентов против PNPLA3 in vivo обеспечивает ингибирование экспрессии гена PNPLA3. РНКи-агенты можно применять в способах лечения заболеваний и расстройств, связанных с PNPLA3, включая неалкогольную жировую дистрофию печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), фиброз печени и алкогольные или неалкогольные заболевания печени, включая цирроз печени.



РНКИ-АГЕНТЫ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ PNPLA3, ИХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

5

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/000,137, поданной 26 марта 2020 г., полностью включенной в настоящий документ путем ссылки.

10

15

20

25

30

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 25 марта 2021 г., называется 103693_002475_PCT_SL.txt и имеет размер 248 025 байт.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Настоящее описание относится к агентам с интерферирующей РНК (РНКи), например, двухцепочечным РНКи-агентам, для ингибирования содержащего пататин-подобный фосфолипазный домен белка 3 (PNPLA3), фармацевтическим композициям, которые включают РНКи-агенты против PNPLA3, и способам их применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Неалкогольная жировая дистрофия печени (NAFLD) является наиболее распространенной в мире хронической болезнью печени и, по оценкам, затрагивает приблизительно 20% мирового населения. В некоторых случаях накопление эктопического жира в печени, называемое стеатозом, инициирует воспаление и гепатоцеллюлярную травму, что приводит к более запущенной стадии заболевания, называемой неалкогольным стеатогепатитом (NASH). Лечение NAFLD часто ориентировано на потерю массы и терапию всех вторичных состояний, таких как резистентность к инсулину или дислипидемия.

[0005] Содержащий пататин-подобный фосфолипазный домен белок 3 (PNPLA3), трансмембранный белок типа II, экспрессируется в различных клетках, включая печень.

В гепатоцитах PNPLA3 экспрессируется на эндоплазматическом ретикулуме и на липидных мембранах и преимущественно проявляет триацилглицерингидролазную активность.

[0006] В настоящем изобретении представлен новый подход к снижению уровней PNPLA3 и лечению гепатологических заболеваний, таких как NAFLD.

5

10

15

20

25

30

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В настоящем документе описаны РНКи-агенты для ингибирования экспрессии гена PNPLA3, содержащие антисмысловую нить, содержащую по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, отличающихся 0 или 1 нуклеотидом от любой из последовательностей SEQ ID NO: 46–60, 176, 181 и 188; и смысловую нить, содержащую нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере частично комплементарна антисмысловой нити.

[0008] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит нуклеотиды 2–18 любой из последовательностей SEQ ID NO: 46–60, 176, 181 и 188.

[0009] В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность из по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, отличающихся 0 или 1 нуклеотидом от любой из последовательностей смысловой нити SEQ ID NO: 2, 3, 4, 9–20, 214, 219 и 220, и при этом смысловая нить имеет область из 17 смежных нуклеотидов с по меньшей мере 85% комплементарностью к антисмысловой нити.

[0010] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один нуклеотид РНКи-агента представляет собой модифицированный нуклеотид или включает модифицированную межнуклеозидную связь.

[0011] Согласно некоторым вариантам осуществления все или по существу все нуклеотиды смысловой и/или антисмысловой нити РНКи-агента представляют собой модифицированные нуклеотиды.

[0012] В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из: 2'-О-метилнуклеотида, 2'-фторнуклеотида, 2'-дезоксинуклеотида, 2',3'-секо-нуклеотидного миметика, блокированного нуклеотида, 2'-F-арабинонуклеотида, 2'-метоксиэтилнуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, рибита, инвертированного нуклеотида, инвертированного 2'-О-метилнуклеотида, инвертированного 2'-дезоксинуклеотида, 2'-аминомодифицированного нуклеотида, 2'-алкилмодифицированного нуклеотида,

морфолинового нуклеотида, винилфосфонат-содержащего нуклеотида, циклопропилфосфонат-содержащего нуклеотида и 3'-О-метилнуклеотида.

5

10

15

20

25

30

[0013] В других вариантах осуществления все или по существу все модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метилнуклеотиды, 2'-фторнуклеотиды или их комбинации.

[0014] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить состоит из, по существу состоит из или содержит нуклеотидную последовательность, представляющую собой любую из модифицированных последовательностей антисмысловой нити SEQ ID NO: 90, 95 и 102.

[0015] В некоторых вариантах осуществления смысловая нить состоит из, по существу состоит из или содержит нуклеотидную последовательность любой из модифицированных последовательностей смысловой нити SEQ ID NO: 131, 136 и 137.

[0016] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представляющую собой любую из модифицированных последовательностей SEQ ID NO: 90, 95 и 102, а смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представляющую собой любую из модифицированных последовательностей SEQ ID NO: 131, 136 и 137.

[0017] В других вариантах осуществления РНКи-агенты связаны с нацеливающим лигандом. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд содержит N-ацетилгалактозамин. В еще других вариантах осуществления нацеливающий лиганд имеет структуру (NAG37) или (NAG37)s. В дополнительных вариантах осуществления нацеливающий лиганд связан со смысловой нитью. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд связан с 5'-концом смысловой нити.

[0018] В некоторых вариантах осуществления нацеливающая смысловая нить имеет длину от 18 до 30 нуклеотидов и антисмысловая нить имеет длину от 18 до 30 нуклеотидов. В других вариантах осуществления как нацеливающая смысловая нить, так и антисмысловая нить имеют длину от 18 до 27 нуклеотидов. В других вариантах осуществления как нацеливающая смысловая нить, так и антисмысловая нить имеют длину от 18 до 24 нуклеотидов. В других вариантах осуществления каждая из смысловой нити и антисмысловой нити имеет длину 21 нуклеотид.

[0019] В некоторых вариантах осуществления изобретения РНКи-агенты имеют два тупых конца.

[0020] В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая нить содержит один или два концевых кэпа. В других вариантах осуществления изобретения

смысловая нить содержит один или два инвертированных лишенных азотистого основания остатка.

5

10

15

20

25

30

[0021] В некоторых вариантах осуществления РНКи-агенты состоят из смысловой нити и антисмысловой нити, которые образуют дуплексную последовательность с SEQ ID NO: (176 и 214); (90 и 131); (181 и 219); (95 и 136); (188 и 220) и/или (102 и 137).

[0022] В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая нить дополнительно включает инвертированные лишенные азотистого основания остатки на 3'-конце нуклеотидной последовательности и/или на 5'-конце нуклеотидной последовательности.

[0023] В некоторых аспектах РНКи-агенты, предложенные в настоящем документе, содержат антисмысловую нить, которая содержит, состоит из или по существу состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности, которая отличается 0 или 1 нуклеотидом от одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 90, 95 и 102; причем а, с, g и и представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно; Аf, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно; s представляет собой фосфоротиоатную связь; и при этом все или по существу все нуклеотиды смысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

[0024] В некоторых вариантах осуществления описанная смысловая нить содержит, состоит из или по существу состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности, которая отличается 0 или 1 нуклеотидом от одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 214, 219 и 256; причем а, с, g, i и и представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин, инозин и уридин соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно; s представляет собой фосфоротиоатную связь; и при этом все или по существу все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В других вариантах осуществления изобретения смысловая нить дополнительно включает инвертированные лишенные азотистого основания остатки на 3'-конце нуклеотидной последовательности и/или на 5'-конце нуклеотидной последовательности и В других вариантах осуществления смысловая нить РНКи-агентов связана с нацеливающим лигандом.

[0025] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд имеет аффинность к рецептору асиалогликопротеинов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд содержит N-ацетилгалактозамин.

[0026] В дополнительных вариантах осуществления нацеливающий лиганд содержит:

5

[0027] В дополнительных вариантах осуществления антисмысловая нить состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 90, 95 и 102, а смысловая нить состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности SEQ

ID NO: 131, 136 и 137; причем а, с, g и и представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно; s представляет собой фосфоротиоатную связь; (invAb) представляет собой инвертированный лишенный азотистого основания остаток дезоксирибозы; и (NAG37)s имеет следующую химическую структуру:

5

10

15

20

[0028] В настоящем документе также описаны композиции, содержащие описанные РНКи-агенты, причем композиции дополнительно содержат фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0029] В настоящем документе также предложены способы ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в клетке, причем способы включают введение в клетку эффективного количества описанных РНКи-агентов или описанных композиций.

[0030] В некоторых вариантах осуществления клетка находится внутри субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человеческого индивида.

[0031] В других вариантах осуществления экспрессию гена PNPLA3 ингибируют на по меньшей мере около 30%. В некоторых вариантах осуществления экспрессию гена PNPLA3 ингибируют на по меньшей мере около 50% в цитоплазме гепатоцитов.

- [0032] В настоящем документе дополнительно предложены способы лечения заболевания или расстройства, связанного с PNPLA3, причем способы включают введение нуждающемуся в этом человеческому индивиду терапевтически эффективного количества описанных композиций.
- 5 **[0033]** В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой NAFLD, NASH, фиброз печени, алкогольную жировую дистрофию печени или цирроз печени.
 - [0034] В некоторых вариантах осуществления РНКи-агенты вводят в дозе от около 0,05 мг/кг до около 5,0 мг/кг массы тела человеческого индивида.
- 10 **[0035]** В других вариантах осуществления РНКи-агент вводят двумя или более дозами.

15

20

25

30

- [0036] В настоящем документе также предложены способы использования описанных РНКи-агентов или описанных композиций для лечения заболевания, расстройства или симптома, по меньшей мере частично опосредованных экспрессией гена PNPLA3.
- [0037] В некоторых вариантах осуществления симптом представляет собой цирроз печени.
- [0038] Кроме того, в настоящем документе предложены способ применения описанных РНКи-агентов или описанных композиций для приготовления фармацевтических композиций для лечения заболевания, расстройства или симптома, по меньшей мере частично опосредованных экспрессией гена PNPLA3.
- [0039] В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой NAFLD, NASH, фиброз печени или алкогольное или неалкогольное заболевание печени, такое как цирроз печени. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент вводят в дозе от около 0,05 мг/кг до около 5,0 мг/кг массы тела человеческого индивида.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0040] На Фиг. 1 представлен график, показывающий экспрессию PNPLA3 в цельной печени относительно исходного уровня, измеренную методом ПЦР у не являющихся человеком приматов (NHP), получавших лечение РНКи-агентом. Исследование № 1. Данные представляют собой геометрическое среднее значение \pm стандартное отклонение (n = 4).

[0041] На Фиг. 2 представлен собой график, демонстрирующий среднюю величину нокдауна мРНК PNPLA3 в цитоплазме гепатоцитов, измеренную с помощью количественного ISH по всем протестированным животным (исследование № 1 и исследование № 2). Исследование № 2. Данные представляют среднее значение \pm стандартное отклонение (n = 14).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0042] Описанные способы будут более понятны со ссылкой на приведенное ниже подробное описание в сочетании с прилагаемыми фигурами, которые являются частью настоящего описания. Следует понимать, что описанные способы не ограничены конкретными способами, описанными и/или приведенными в настоящем документе, и что используемая в настоящем документе терминология предназначена для описания конкретных вариантов осуществления исключительно в качестве примера и не призвана носить ограничивающий характер в отношении заявленных способов.

[0043] Следует понимать, что определенные характеристики раскрываемых способов, которые для ясности описаны в настоящем документе в контексте отдельных вариантов осуществления, также можно использовать в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, можно также использовать определенные характеристики раскрываемых способов, описанные для краткости в контексте одного варианта

осуществления, по отдельности или в любой подкомбинации.

[0044] Определения

5

10

15

20

25

30

[0045] При использовании в настоящем документе термин «РНКи-агент» (также обозначается как «триггер РНКи») означает композицию, которая содержит олигонуклеотидную молекулу РНК или РНК-подобную олигонуклеотидную молекулу (например, химически модифицированную РНК), которая способна нарушать или ингибировать (например, нарушать или ингибировать при подходящих условиях) трансляцию транскриптов матричной РНК (мРНК) специфичным для данной последовательности образом. В настоящем документе РНКи-агенты ΜΟΓΥΤ функционировать посредством механизма РНК-интерференции (т. е. индуцировать РНК-интерференцию посредством взаимодействия c системой пути РНКинтерференции (РНК-индуцированный комплекс выключения гена или RISC) клеток млекопитающих) или любого (-ых) альтернативного (-ых) механизма (-ов) или пути (- ей). Хотя считается, что РНКи-агенты, поскольку этот термин используется в настоящем документе, функционируют преимущественно посредством механизма РНК-интерференции, описанные РНКи-агенты не связаны или не ограничены какимлибо конкретным путем или механизмом действия. РНКи-агенты, описанные в настоящем документе, состоят из смысловой нити и антисмысловой нити и включают в себя, без ограничений: короткие (или малые) интерферирующие РНК (миРНК), двухцепочечные РНК (дцРНК), микро-РНК (микРНК), короткие шпилечные РНК (кшРНК) и субстраты фермента Дайсер. Антисмысловая нить РНКи-агентов, описанных в настоящем документе, по меньшей мере частично комплементарна мРНК, на которую осуществляется нацеливание (т. е. мРНК PNPLA3). РНКи-агенты могут включать в себя один или более модифицированных нуклеотидов и/или одну или более нефосфодиэфирных связей.

[0046] При использовании в настоящем документе термины «выключать», «снижать», «ингибировать», «подавлять» или «понижать активность» в отношении экспрессии данного гена означают, что экспрессия гена, измеренная по концентрации РНК, транскрибированной из гена, или по концентрации полипептида, белка или субъединицы белка, транслированного с мРНК в клетке, группе клеток, ткани, органе или субъекте, в котором ген транскрибирован, уменьшается при лечении клетки, группы клеток, ткани, органа или субъекта РНКи-агентами, описанными в настоящем документе, по сравнению со второй клеткой, группой клеток, тканью, органом или субъектом, в отношении которых не проводили такого лечения.

[0047] При использовании в настоящем документе термины «последовательность» и «нуклеотидная последовательность» означают непрерывный ряд или порядок нуклеотидных оснований или нуклеотидов, описанный рядом букв с использованием стандартной номенклатуры. Молекула нуклеиновой кислоты может содержать немодифицированные и/или модифицированные нуклеотиды. Нуклеотидная последовательность может содержать немодифицированные и/или модифицированные нуклеотиды.

[0048] Используемый в настоящем документе термин «основание», «нуклеотидное основание» или «нуклеотид» представляет собой гетероциклическое пиримидиновое или пуриновое соединение, которое представляет собой компонент полинуклеотида, включает первичные пуриновые основания аденин и гуанин и первичные пиримидиновые основания цитозин, тимин и урацил. Нуклеотид может быть немодифицированным. Нуклеотид может быть дополнительно модифицирован таким

образом, чтобы включать, без ограничений, универсальные основания, гидрофобные основания, смешанные основания, основания увеличенного размера и фторсодержащие основания. (См., например, публикацию Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008). Синтез таких модифицированных нуклеотидов (включая фосфорамидитовые соединения, которые включают модифицированные нуклеотиды) известен в данной области.

5

10

15

20

25

30

При использовании в настоящем документе, если не указано иное, термин «комплементарный», используемый для описания первого нуклеотидного основания или нуклеотидной последовательности (например, смысловой нити РНКи-агента или целевой мРНК) по отношению ко второму нуклеотидному основанию или нуклеотидной последовательности (например, антисмысловой последовательности РНКи-агента или одноцепочечного антисмыслового олигонуклеотида), означает способность олигонуклеотида или полинуклеотида, включающего первую нуклеотидную последовательность, к гибридизации (формированию водородных связей между парами оснований в физиологических для млекопитающего условиях (или иных приемлемых условиях in vitro)) и формированию дуплексной или двойной спиральной структуры в определенных стандартных условиях с олигонуклеотидом, включающим вторую нуклеотидную последовательность. Средний специалист в данной области сможет выбрать набор условий, наиболее подходящих для проверки гибридизации. Комплементарные последовательности включают пары оснований, образованные по Уотсону — Крику, или пары оснований, образованные не по Уотсону — Крику и включают в себя природные или модифицированные нуклеотиды или миметики нуклеотидов, по меньшей мере в степени, обеспечивающей соблюдение вышеприведенных требований гибридизации. Идентичность по комплементарность последовательности не зависит от модификации. Например, а и Af, описанные в настоящем документе, комплементарны U (или T) и идентичны A для целей определения идентичности или комплементарности.

[0050]использовании В настоящем документе термин «абсолютно комплементарный» или «полностью комплементарный» означает, что гибридизованной паре нуклеотидных оснований или молекул нуклеотидной последовательности все (100%) основания связной последовательности первого олигонуклеотида будут гибридизироваться с таким же числом оснований в связной последовательности второго олигонуклеотида. Непрерывная последовательность может содержать всю или часть первой или второй нуклеотидной последовательности.

[0051]При использовании В настоящем документе термин «частично комплементарный» означает, что в гибридизированной паре нуклеотидных оснований или молекул нуклеотидных последовательностей по меньшей мере 70% (но не все) первого олигонуклеотида основания связной последовательности будут гибридизироваться с таким же числом оснований в связной последовательности второго олигонуклеотида. Непрерывная последовательность может содержать всю или часть первой или второй нуклеотидной последовательности.

5

10

15

20

25

30

[0052] При использовании в настоящем документе термин «по существу комплементарный» означает, что в гибридизированной паре нуклеотидных оснований или молекул нуклеотидных последовательностей по меньшей мере 85% (но не все) из оснований связной последовательности первого олигонуклеотида будут гибридизироваться с таким же числом оснований связной последовательности второго олигонуклеотида. Непрерывная последовательность может содержать всю или часть первой или второй нуклеотидной последовательности.

[0053] Используемые в настоящем документе термины «комплементарный», «полностью комплементарный», «частично комплементарный» и «по существу комплементарный» используются в отношении совпадения нуклеотидных оснований или нуклеотидов между смысловой нитью и антисмысловой нитью РНКи-агента или между антисмысловой нитью РНКи-агента и последовательностью мРНК PNPLA3.

[0054] При использовании в настоящем документе термин «по существу идентичный» или «существенная идентичность» по отношению к нуклеотидной последовательности означает, что нуклеотидная последовательность (или часть нуклеотидной последовательности) на по меньшей мере около 85% или более, предпочтительно на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 95% или на по меньшей мере 99% идентична эталонной последовательности. Процент идентичности последовательности определяли путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения. Процентное значение рассчитывают путем определения числа положений, в которых в обеих последовательностях встречаются нуклеиновые основания того же типа, с получением числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножения результата на 100 с получением процентного значения идентичности последовательности. Описанные в настоящем документе изобретения охватывают нуклеотидные последовательности, по существу идентичные последовательностям, описанным в настоящем документе.

[0055] Используемые в настоящем документе термины «индивид», «пациент» и «субъект» используются взаимозаменяемо для обозначения представителя любого вида животного, включая, без ограничений, птиц, людей и других приматов, а также других млекопитающих, включая коммерчески значимых млекопитающих или животных моделей, таких как мыши, крысы, обезьяны, крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, кошки и собаки. Предпочтительно субъект представляет собой человека.

5

10

15

20

25

30

[0056] При использовании в настоящем документе термины «лечить», «лечение» и т. п. означают способы или стадии, выполняемые для ослабления или уменьшения числа, тяжести и/или частоты одного или более симптомов заболевания у субъекта. Используемый в настоящем документе термин «лечение» и «терапия» может включать в себя профилактику, лечение, профилактическое лечение и/или ингибирование или уменьшение количества, тяжести и/или частоты появления одного или более симптомов заболевания у субъекта.

[0057] При использовании в настоящем документе фраза «введение в клетку» в отношении РНКи-агента означает функционализированную доставку РНКи-агента в клетку. Фраза «функционализированная доставка» означает доставку РНКи-агента в клетку таким образом, чтобы РНКи-агент мог проявлять ожидаемую биологическую активность, например ингибирование экспрессии гена, специфичное для конкретной последовательности.

[0058] Если не указано иное, применение символа в контексте настоящего документа означает, что сюда может быть присоединена любая группа или группы, которые соответствуют объему изобретений, описанных в настоящем документе.

[0059] При использовании в настоящем документе термин «изомеры» относится к соединениям, имеющим идентичные молекулярные формулы, но отличающимся по характеру или последовательности связывания их атомов или расположению их атомов в пространстве. Изомеры, которые различаются по расположению своих атомов в пространстве, называются «стереоизомерами». Стереоизомеры, которые не являются зеркальным отражением друг друга, называются «диастереомерами», а стереоизомеры, которые являются зеркальными отражениями, не совпадающими при наложении друг на друга, называются «энантиомерами» или, в некоторых случаях, оптическими изомерами. Атом углерода, связанный с четырьмя неидентичными заместителями, называется «хиральным центром».

[0060]В настоящем документе, если специально не указано, что структура имеет конформацию, для каждой структуры, в которой присутствуют конкретную следовательно, обуславливает образование асимметричные центры и которая, энантиомеров, диастереомеров или других стереоизомерных конфигураций, предполагается, что каждая структура, описанная в настоящем документе, отражает все такие возможные изомеры, включая их оптически чистые и рацемические формы. Например, предполагается, что структуры, описанные в настоящем документе, охватывают смеси диастереомеров, а также отдельные стереоизомеры.

5

10

15

20

25

30

[0061] В контексте настоящего документа термины «содержащий», «включающий в себя» и «имеющий в составе» и «характеризующийся» являются взаимозаменяемыми, включающими, неограничивающими терминами, которые не исключают дополнительных, не перечисленных элементов или стадий способа. Следует понимать, что любое упоминание в настоящем документе термина «содержащий», в частности в описании компонентов композиции или в описании элементов устройства, охватывает те композиции и способы, которые состоят по существу из и состоят из перечисленных компонентов или элементов.

[0062] При использовании в формуле изобретения, приведенной в настоящем документе, фраза «состоящий из» исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не упомянутый в формуле изобретения. При использовании в формуле изобретения настоящего документа фраза «состоящий по существу из» ограничивает объем формулы изобретения конкретными материалами или стадиями «и теми, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики» заявленного изобретения.

[0063] Среднему специалисту в данной области будет легко понять, что соединения и композиции, описанные в настоящем документе, могут иметь определенные атомы (например, атомы N, O или S) в протонированном или депротонированном состоянии в зависимости от среды, в которой находится соединение или композиция. Соответственно, при использовании в настоящем документе структур, представленных в настоящем документе, предполагается, что определенные функциональные группы, такие как, например, OH, SH или NH, могут быть протонированными или депротонированными. Предполагается, что настоящее изобретение охватывает описанные соединения и композиции, независимо от состояния их протонирования, зависящего от окружающей среды (например, рН), как можно будет легко понять среднему специалисту в данной области. Соответственно, следует понимать, что

соединения, описанные в настоящем документе, имеющие лабильные протоны или щелочные атомы, представляют собой солевые формы соответствующего соединения. Соединения, описанные в настоящем документе, могут находиться в форме свободной кислоты, свободного основания или соли. Следует понимать, что фармацевтически приемлемые соли соединений, описанных в настоящем документе, входят в объем настоящего изобретения.

5

10

15

20

25

30

[0064] В настоящем документе термин «связанный» или «конъюгированный» применительно к связи между двумя соединениями или молекулами означает, что два соединения или молекулы соединены ковалентной связью. Если не указано иное, термины «соединенный» и «конъюгированный» при использовании в настоящем документе могут относиться к связи между первым соединением и вторым соединением либо с любыми промежуточными атомами, либо с группами атомов, либо без них.

[0065] Используемый в настоящем документе термин «включающий» используется взаимозаменяемо с фразой «включая, без ограничений». Термин «или» используется в настоящем документе взаимозаменяемо с термином «и/или», если контекст явно не указывает иное.

[0066] Все используемые в настоящем документе технические и научные термины, если не дано их иное определение, имеют общепринятое значение, понятное обычному специалисту в данной области. В настоящем документе описаны примеры способов и материалов, хотя для проверки или анализа настоящего изобретения можно использовать подходящие способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным ниже. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие упоминаемые в настоящем документе литературные источники включены в настоящий документ в полном объеме путем ссылки. В случае противоречий настоящее описание, включая определения, будет иметь приоритет. Кроме того, материалы, способы и примеры приведены только для иллюстрации и не имеют ограничительного характера.

[0067] Прочие объекты, признаки, аспекты и преимущества изобретения станут понятны из нижеприведенных подробного описания и прилагаемых фигур, а также из формулы изобретения.

Подробное описание

РНКи-агенты

5

10

15

20

25

30

[0068] В настоящем документе описаны РНКи-агенты для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 (называемые в настоящем документе РНКи-агентами против PNPLA3 или триггерами PHKи против PNPLA3). Каждый PHKи-агент против PNPLA3 содержит смысловую нить и антисмысловую нить. Каждая из смысловой нити и антисмысловой нити может иметь длину от 16 до 49 нуклеотидов. Смысловая и антисмысловая нити могут иметь одинаковую длину, или они могут быть разной длины. В некоторых вариантах осуществления каждая из смысловой и антисмысловой нити независимо имеет длину от 18 до 27 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждая из смысловой и антисмысловой нитей имеет длину от 21 до 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждая из смысловой и антисмысловой нити имеет длину от 21 до 24 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждая из смысловой и антисмысловой нити независимо имеет длину от 19 до 21 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить имеет длину около 19 нуклеотидов, тогда как антисмысловая нить имеет длину около 21 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить имеет длину около 21 нуклеотида, тогда как антисмысловая нить имеет длину около 23 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить имеет длину в 23 нуклеотида, а антисмысловая нить имеет длину 21 в нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления каждая из смысловой нити и антисмысловой нити имеет длину 21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления каждая из смысловой и антисмысловой нити РНКи-агента независимо имеет длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 или 39 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный РНКи-агент имеет дуплексную длину около 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов.

[0069] Примеры нуклеотидных последовательностей, используемых для формирования РНКи-агентов против PNPLA3, представлены в таблицах 2, 3 и 4. Примеры дуплексов РНКи-агентов, которые включают в себя последовательности смысловой и антисмысловой нити из таблиц 2, 3 и 4, показаны в таблицах 5А и 5В.

[0070] В некоторых вариантах осуществления область абсолютной, существенной или частичной комплементарности между смысловой нитью и антисмысловой нитью имеет длину 16–26 (например, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26) нуклеотидов и находится на 5'-конце антисмысловой нити или вблизи него (например, эта область

может быть отделена от 5'-конца антисмысловой нити 0, 1, 2, 3 или 4 нуклеотидами, которые не являются абсолютно, по существу или частично комплементарными).

5

10

15

20

25

30

[0071] Смысловая нить описываемых в настоящем документе РНКи-агентов против PNPLA3 включает в себя по меньшей мере 16 последовательных нуклеотидов, которые имеют степень идентичности по меньшей мере 85% с последовательностью сердцевинного участка (также называемой в настоящем документе «сердцевинным участком» или «сердцевинной последовательностью») из такого же числа нуклеотидов в мРНК PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления последовательность сердцевинного участка смысловой нити на 100% (абсолютно) комплементарна или на по меньшей мере около 85% (по существу) комплементарна последовательности сердцевинного участка в антисмысловой нити, и, таким образом, последовательность сердцевинного участка смысловой нити обычно абсолютно идентична или на по меньшей мере около 85% идентична нуклеотидной последовательности такой же длины (иногда называемой, целевой последовательностью), например, присутствующей в целевой мРНК PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления данная последовательность сердцевинного участка смысловой нити составляет 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида в длину. В некоторых вариантах осуществления данная последовательность сердцевинного участка смысловой нити составляет в длину 17 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления данная последовательность сердцевинного участка смысловой нити составляет в длину 19 нуклеотидов.

Антисмысловая нить описываемых в настоящем документе РНКи-агентов [0072] против PNPLA3 включает в себя по меньшей мере 16 последовательных нуклеотидов, меньшей степень комплементарности ПО имеют последовательности сердцевинного участка из такого же числа нуклеотидов в мРНК PNPLA3 и к последовательности сердцевинного участка из такого же числа нуклеотидов в соответствующей смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления последовательность сердцевинного участка антисмысловой нити на 100% (абсолютно) комплементарна или на по меньшей мере около 85% (по существу) комплементарна нуклеотидной (например, последовательности целевой последовательности) такой же длины, присутствующей в целевой мРНК PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления данная последовательность сердцевинного участка антисмысловой нити составляет в длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления данная последовательность сердцевинного участка антисмысловой нити составляет в длину 19 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления данная последовательность сердцевинного участка антисмысловой нити составляет в длину 17 нуклеотидов. Последовательность сердцевинного участка смысловой нити может иметь ту же длину, что и соответствующая антисмысловая сердцевинная последовательность, или она может иметь другую длину.

5

10

15

20

25

30

Смысловую и антисмысловую нити РНКи-агента против PNPLA3 отжигают с [0073] образованием дуплекса. Смысловая нить и антисмысловая нить РНКи-агента против PNPLA3 могут быть частично, по существу или полностью комплементарными друг другу. В пределах комплементарной дуплексной области последовательность сердцевинного участка смысловой нити на по меньшей мере 85% комплементарна или на 100% комплементарна последовательности сердцевинного участка антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления последовательность сердцевинного участка смысловой нити содержит последовательность из по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22 или по меньшей мере 23 нуклеотидов, которая на по меньшей мере 85% или на 100% комплементарна соответствующей последовательности из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотидов последовательности сердцевинного участка антисмысловой нити (т. е. последовательности сердцевинного участка смысловой нити и антисмысловой нити РНКи-агента против PNPLA3 имеют область из по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22 или по меньшей мере 23 нуклеотидов, которая спарена по основаниям на по меньшей мере 85% или на 100%).

[0074] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить описываемого в настоящем документе РНКи-агента против PNPLA3 отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей антисмысловой нити, приведенных в таблице 2 или таблице 3. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить описываемого в настоящем документе РНКи-агента против PNPLA3 отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей смысловой нити, приведенных в таблице 2 или таблице 4.

[0075] В некоторых вариантах осуществления смысловая нить и/или антисмысловая нить могут необязательно и независимо содержать дополнительные 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов (удлинение) на 3'-конце, 5'-конце или на обоих 3'- и 5'-концах последовательностей сердцевинного участка. Дополнительные нуклеотиды

антисмысловой нити (при наличии) могут быть комплементарными или не комплементарными соответствующей последовательности в мРНК PNPLA3. Дополнительные нуклеотиды смысловой нити (при наличии) могут быть идентичными или не идентичными соответствующей последовательности в мРНК PNPLA3. Дополнительные нуклеотиды антисмысловой нити (при наличии) могут быть комплементарными или не комплементарными соответствующим дополнительным нуклеотидам смысловой нити (при наличии).

5

10

15

20

25

30

В настоящем документе удлинение содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов на [0076] 5- и/или 3'-конце последовательности сердцевинного участка смысловой нити и/или последовательности сердцевинного участка антисмысловой нити. Удлиняющие нуклеотиды смысловой нити могут быть комплементарными на комплементарными нуклеотидам последовательности сердцевинного участка или удлиняющим нуклеотидам в соответствующей антисмысловой нити. И наоборот, удлиняющие нуклеотиды на антисмысловой нити могут быть комплементарными или не комплементарными нуклеотидам последовательности сердцевинного участка или удлиняющим нуклеотидам в соответствующей смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить РНКи-агента содержат удлинения на 3'- и 5'-конце. В некоторых вариантах осуществления один или более из 3'- удлиняющих нуклеотидов одной нити спарены по основаниям с одним или более 5'- удлиняющими нуклеотидами другой нити. В других вариантах осуществления один или более из 3'- удлиняющих нуклеотидов одной нити не спарены по основаниям с одним или более 5'- удлиняющими нуклеотидами другой нити. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 имеет антисмысловую нить, имеющую 3'-удлинение, и смысловую нить, имеющую 5'-удлинение. В некоторых вариантах осуществления удлиняющий (-ие) нуклеотид (-ы) не имеет (-ют) пар и образует (-ют) выступ. В настоящем документе термин «выступ» относится к фрагменту из одного или более непарных нуклеотидов, размещенных на конце либо смысловой нити, либо антисмысловой нити, без образования части гибридизованной или дуплексной части описываемого в настоящем документе РНКи-агента.

[0077] В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 включает антисмысловую нить, имеющую 3'-удлинение размером 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. В других вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 включает антисмысловую нить, имеющую 3'-удлинение размером в 1, 2 или 3 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления один или более из удлиняющих

нуклеотидов антисмысловой нити включают нуклеотиды, которые комплементарны соответствующей последовательности мРНК PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления один или более из удлиняющих нуклеотидов антисмысловой нити включают нуклеотиды, которые не комплементарны соответствующей последовательности мРНК PNPLA3.

[0078] В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 включает смысловую нить, имеющую 3'-удлинение размером 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления один или более из удлиняющих нуклеотидов смысловой нити включают аденозиновые, урациловые или тимидиновые нуклеотиды, динуклеотид АТ или нуклеотиды, которые соответствуют или идентичны нуклеотидам в последовательности мРНК PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления 3'-удлинение смысловой нити, без ограничений, включает в себя или состоит из одной из следующих последовательностей: Т, UT, TT, UU, UUT, TTT или TTTT (каждый элемент записан от 5' к 3').

[0079] Смысловая нить может иметь 3'-удлинение и/или 5'-удлинение. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 включает смысловую нить, имеющую 5'-удлинение размером 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления один или более из удлиняющих нуклеотидов смысловой нити включают нуклеотиды, которые соответствуют или идентичны нуклеотидам в последовательности мРНК PNPLA3.

Примеры последовательностей, используемых для формирования РНКи-агентов против PNPLA3, представлены в таблицах 2, 3 и 4. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить PHКи-агента против PNPLA3 включает в себя любую из последовательностей, представленных в таблицах 2 или 3. В определенных вариантах осуществления антисмысловая нить PHКи-агента против PNPLA3 содержит или состоит из любой из модифицированных последовательностей, представленных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить PHКи-агента против PNPLA3 включает в себя последовательностей из нуклеотидов (от 5′ конца к → 3′ концу) 1–17, 2–15, 2–17, 1–18, 2–18, 1–19, 2–19, 1–20, 2–20, 1–21 или 2–21 любой из последовательностей, представленных в таблицах 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить PHКи-агента против PNPLA3 включает в себя любую из последовательностей, представленных в таблицах 2 или 4. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить PHКи-агента против PNPLA3 включает в себя последовательностей, представленных в таблицах 2 или 4. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить PHКи-агента против PNPLA3 включает в себя последовательностей из нуклеотидов (от 5′ конца к → 3′ концу) 1–18, 1–19, 1–20, 1–21,

2–19, 2–20, 2–21, 3–20, 3–21 или 4–21 любой из последовательностей, представленных в таблицах 2 или 4. В определенных вариантах осуществления смысловая нить РНКиагента против PNPLA3 содержит или состоит из любой из модифицированных последовательностей, представленных в таблице 4.

5

10

15

20

25

30

[0081] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити РНКи-агентов, описанных в настоящем документе, содержат одинаковое число нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити РНКи-агентов, описанных в настоящем документе, содержат различные числа нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 5′-конец смысловой нити и 3′-конец антисмысловой нити РНКи-агента формируют тупой конец. В некоторых вариантах осуществления 3′-конец смысловой нити и 5′-конец антисмысловой нити РНКи-агента формируют тупой конец. В некоторых вариантах осуществления оба конца РНКи-агента формируют тупые концы. В некоторых вариантах осуществления ни один из концов РНКи-агента не является тупым. В настоящем документе термин «тупой конец» относится к концу двухцепочечного РНКи-агента, в котором концевые нуклеотиды двух соединенных нитей являются комплементарными (формируют комплементарную пару оснований).

[0082] В некоторых вариантах осуществления 5'-конец смысловой нити и 3'-конец антисмысловой нити РНКи-агента формируют раскрытый конец. В некоторых вариантах осуществления 3'-конец смысловой нити и 5'-конец антисмысловой нити РНКи-агента формируют раскрытый конец. В некоторых вариантах осуществления оба РНКи-агента формируют раскрытый конец. В некоторых осуществления ни один из концов РНКи-агента не является раскрытым. В настоящем документе термин «раскрытый конец» относится к концу двухцепочечного РНКиагента, в котором концевые нуклеотиды двух соединенных нитей формируют пару (т. е. не формируют выступ), но не являются комплементарными (т. е. формируют некомплементарную пару). В некоторых вариантах осуществления один или более непарных нуклеотидов на конце одной нити двухцепочечного РНКи-агента образуют выступ. Непарные нуклеотиды могут находиться на смысловой нити или антисмысловой нити, создавая выступы на 3'-конце или на 5'-конце. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент содержит: тупой конец и раскрытый конец, тупой конец и 5'-выступающий конец, тупой конец и 3'-выступающий конец, раскрытый конец и 5'-выступающий конец, раскрытый конец и 3'-выступающий конец, два 5'-выступающих конца, два 3'-выступающих конца, 5'-выступающий конец и 3'- выступающий конец, два раскрытых конца или два тупых конца. Как правило, при их наличии, выступы находятся на 3'-концах смысловой нити, антисмысловой нити, или как смысловой нити, так и антисмысловой нити.

[0083] Описываемые в настоящем документе РНКи-агенты против PNPLA3 также могут быть составлены из одного или более модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления по существу все нуклеотиды смысловой нити и по существу все нуклеотиды антисмысловой нити РНКи-агента против PNPLA3 представляют собой модифицированные нуклеотиды. Описываемые в настоящем документе РНКи-агенты против PNPLA3 могут быть дополнительно составлены из одной или более модифицированных межнуклеозидных связей, например одной или более фосфоротиоатных связей. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 содержит один или более модифицированных нуклеотидов и одну или более модифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления 2′-модифицированный нуклеотид комбинируют с модифицированной межнуклеозидной связью.

[0084] В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 получают или предлагают в виде соли, смешанной соли или свободной кислоты. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 получают в виде натриевой соли. Такие формы, которые хорошо известны в данной области, входят в объем описываемого в настоящем документе изобретения.

Модифицированные нуклеотиды

5

10

15

20

25

30

[0085] Модифицированные нуклеотиды при использовании в различных олигонуклеотидных конструктах могут сохранять активность соединения в клетках, в то же время повышая стабильность данных соединений в сыворотке, а также могут сводить к минимуму возможность активации активности интерферона при введении такого олигонуклеотидного конструкта у людей.

[0086] В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 содержит один или более модифицированных нуклеотидов. В настоящем документе «модифицированный нуклеотид» представляет собой нуклеотид, не являющийся рибонуклеотидом (2'-гидроксилнуклеотид). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) нуклеотидов являются

5

10

15

20

25

30

модифицированными нуклеотидами. В настоящем документе модифицированные нуклеотиды могут, без ограничений, включать в себя дезоксирибонуклеотиды, миметики нуклеотидов, нуклеотиды, 2'лишенные азотистого основания модифицированные нуклеотиды, инвертированные нуклеотиды, содержащие модифицированные нуклеотидные основания нуклеотиды, мостиковые нуклеотиды, $(\Pi H K),$ 2′,3′-секо-нуклеотидные пептидные нуклеиновые кислоты (разблокированные аналоги нуклеотидных оснований), заблокированные нуклеотиды, 3'-О-метокси (2'-межнуклеозидно связанные) нуклеотиды, 2'-F-арабинонуклеотиды, 5'-Me, 2'-фторуклеотиды, морфолиновые нуклеотиды, винилфосфонатдезоксирибонуклеотиды, винилфосфонат-содержащие нуклеотиды и циклопропилфосфонат-содержащие нуклеотиды. 2'-Модифицированные нуклеотиды (т. е. нуклеотид с группой, отличной от гидроксильной группы, в положении 2' пятичленного сахарного кольца), без ограничений, включают в себя 2'-Ометилнуклеотиды, 2'-фторнуклеотиды (также называемые в настоящем документе 2'дезокси-2'-фторнуклеотидами). 2'-дезоксинуклеотиды, 2'-метоксиэтил (2'-O-2метоксиэтил) нуклеотиды (также называемые 2'-МОЕ), 2'-аминонуклеотиды и 2'алкилнуклеотиды. Все положения в данном соединении необязательно должны быть одинаково модифицированы. И наоборот, в одном РНКи-агенте против PNPLA3 или даже в одном его нуклеотиде можно выполнить более одной модификации. Смысловые нити и антисмысловые нити РНКи-агента против PNPLA3 могут быть синтезированы и/или модифицированы способами, известными в данной области. Модификация в одном нуклеотиде не зависит от модификации в другом нуклеотиде.

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

5

10

15

20

25

30

В некоторых вариантах осуществления 5'- и/или 3' -концы антисмысловой [0088]нити могут включать в себя лишенные азотистого основания остатки (Ab), которые также могут обозначаться как «лишенный азотистого основания сайт» или «лишенный азотистого основания нуклеотид». Лишенный азотистого основания остаток (Ab) представляет собой нуклеотид или нуклеозид, у которого отсутствует нуклеотидное основание в положении 1' сахарного фрагмента. (См., например, патент США № 5,998,203). В некоторых вариантах осуществления лишенный азотистого основания остаток может быть размещен внутри в последовательности нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления фрагменты Ab или AbAb могут быть добавлены к 3'-концу антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления 5'-конец смысловой нити может включать в себя один или более дополнительных лишенных азотистого основания остатков (например, (Ab) или (AbAb)). В некоторых осуществления фрагменты UUAb, UAb или Ab добавлены к 3'-концу смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления лишенный азотистого основания (дезоксирибозный) остаток может быть заменен на рибитный (лишенный азотистого основания рибозный) остаток.

[0089] В некоторых вариантах осуществления все или по существу все нуклеотиды РНКи-агента представляют собой модифицированные нуклеотиды. В настоящем документе РНКи-агент, в котором по существу все из имеющихся нуклеотидов являются модифицированными нуклеотидами, представляет собой РНКи-агент, в котором четыре или менее (т. е. 0, 1, 2, 3 или 4) нуклеотидов как в смысловой нити, так и в антисмысловой нити являются рибонуклеотидами (т. е. не модифицированы). В настоящем документе смысловая нить, в которой по существу все из имеющихся нуклеотидов являются модифицированными нуклеотидами, представляет собой смысловую нить, причем два или менее (т. е. 0, 1 или 2) нуклеотидов в смысловой нити являются немодифицированными рибонуклеотидами. В настоящем документе антисмысловая смысловая нить, в которой по существу все из имеющихся нуклеотидов являются модифицированными нуклеотидами, представляет собой антисмысловую нить, в которой два или менее (т. е. 0, 1 или 2) нуклеотидов в смысловой нити являются немодифицированными рибонуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеотидов РНКи-агента представляют собой немодифицированные рибонуклеотиды.

Модифицированные межнуклеозидные связи

5

10

15

20

25

30

[0090] В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеотидов РНКиагента против PNPLA3 связаны нестандартными связями или остовами (т. е. модифицированными межнуклеозидными связями или модифицированными остовами). Модифицированные межнуклеозидные связи или остовы, без ограничений, включают в себя фосфоротиоатные группы (обозначаемые в настоящем документе строчной буквой s), хиральные фосфоротиоаты, тиофосфаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, алкилфосфонаты (например, метилфосфонаты или 3'-алкиленфосфонаты), хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты (например, 3'-аминофосфорамидат, аминоалкилфосфорамидаты или тионофосфорамидаты), тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры, морфолиновые связи, боранофосфаты, имеющие обычные связи 3'-5', 2'-5'-связанные аналоги боранофосфатов или боранофосфаты, имеющие обратную полярность, где смежные пары нуклеозидных звеньев связаны связями от 3'-5' к 5'-3' или от 2'-5' к 5'-2'. В некоторых вариантах осуществления в модифицированной межнуклеозидной связи или остове отсутствует атом фосфора. Модифицированные межнуклеозидные связи, не имеющие атома фосфора, включают в себя, без ограничений, короткоцепочечные алкильные или циклоалкильные связи между сахарами, смешанные гетероатомные и алкильные или циклоалкильные связи между сахарами или одну или более короткоцепочечных гетероатомных или гетероциклических связей между сахарами. В некоторых вариантах осуществления модифицированные межнуклеозидные остовы включают в себя, без ограничений, силоксановые остовы, сульфидные остовы, сульфоксидные остовы, сульфоновые остовы, формацетиловые и тиоформацетиловые остовы, метиленформацетиловые и тиоформацетиловые остовы, алкен-содержащие остовы, сульфаматные остовы, метилениминовые и метиленгидразиновые остовы, сульфонатные и сульфонамидные остовы, амидные остовы и другие остовы, имеющие смешанные компоненты N, O, S и CH₂.

[0091] В некоторых вариантах осуществления смысловая нить РНКи-агента против PNPLA3 может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфоротиоатных связей, антисмысловая нить РНКи-агента против PNPLA3 может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфоротиоатных связей, или как смысловая нить, так и антисмысловая нить независимо могут содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфоротиоатных связей. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить РНКи-агента против PNPLA3 может

содержать 1, 2, 3 или 4 фосфоротиоатные связи, антисмысловая нить РНКи-агента против PNPLA3 может содержать 1, 2, 3 или 4 фосфоротиоатные связи, или как смысловая нить, так и антисмысловая нить независимо могут содержать 1, 2, 3 или 4 фосфоротиоатные связи.

[0092] В некоторых вариантах осуществления смысловая нить РНКи-агента против PNPLA3 содержит по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах осуществления фосфоротиоатные межнуклеозидные связи находятся между нуклеотидами в положениях 1-3 от 3'-конца смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления одна фосфоротиоатная межнуклеозидная связь находится на 5'-конце нуклеотидной последовательности смысловой нити, а другая фосфоротиоатная межнуклеозидная связь находится на 3'-конце нуклеотидной последовательности смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления две фосфоротиоатные межнуклеозидные связи размещены на 5'-конце смысловой нити, а другие две фосфоротиоатные межнуклеозидные связи находятся на 3'-конце смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить не включает в себя фосфоротиоатные межнуклеозидные связи между нуклеотидами, но содержит одну, две или три фосфоротиоатные связи между концевыми нуклеотидами как на 5'-, так и на 3'-конце, а также необязательно присутствующие концевые кэпирующие инвертированные лишенные азотистого основания остатки. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд связан co смысловой нитью через фосфоротиоатную связь.

[0093] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить РНКи-агента против PNPLA3 содержит четыре фосфоротиоатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах осуществления четыре фосфоротиоатные межнуклеозидные связи находятся между нуклеотидами в положениях 1–3 от 5'-конца антисмысловой нити и между нуклеотидами в положениях 19–21, 20–22, 21–23, 22–24, 23–25 или 24–26 от 5'-конца. В некоторых вариантах осуществления три фосфоротиоатные межнуклеозидные связи размещены между положениями 1–4 от 5'-конца антисмысловой нити, а четвертая фосфоротиоатная межнуклеозидная связь размещена между положениями 20–21 от 5'-конца антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 содержит по меньшей мере три или четыре фосфоротиоатные межнуклеозидные связи в антисмысловой нити.

Кэпирующие остатки или фрагменты

5

10

15

20

25

30

5

10

15

20

25

30

[0094] В некоторых вариантах осуществления смысловая нить может включать в себя один или более кэпирующих остатков или фрагментов, иногда обозначаемых в данной области как «кэпирующая группа», «концевой кэп» или «кэпирующий остаток». В настоящем документе «кэпирующий остаток» представляет собой ненуклеотидное соединение или иной фрагмент, который может быть встроен на одном или более концах нуклеотидной последовательности описываемого в настоящем документе РНКи-агента. Кэпирующий остаток может в некоторых случаях обеспечить РНКиагента определенными полезными свойствами, такими как, например, защита от деградации экзонуклеазами. В некоторых вариантах осуществления в качестве кэпирующих остатков добавляются инвертированные лишенные азотистого основания остатки (invAb) (также называемые в данной области «инвертированными лишенными азотистого основания участками»). (см., например, F. Czauderna, Nucleic Acids Res., 2003, 31(11), 2705-16). Кэпирующие остатки по существу известны в данной области и включают в себя, например, инвертированные лишенные азотистого основания остатки, а также углеродные нити, такие как терминальные C_3H_7 -(пропильная), C_6H_{13} -(гексильная) или $C_{12}H_{25}$ -(додецильная) группы. В некоторых вариантах осуществления кэпирующий остаток присутствует либо на 5'-конце, либо на 3'-конце, либо одновременно на 5'- и 3'-концах смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления 5'-конец и/или 3'-конец смысловой нити могут включать в себя более инвертированного лишенного азотистого основания дезоксирибозного фрагмента в качестве кэпирующего остатка.

[0095] В некоторых вариантах осуществления один или более инвертированных лишенных азотистого основания остатков (invAb) добавляют к 3'-концу смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления один или более инвертированных лишенных азотистого основания остатков (invAb) добавляют к 5'-концу смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления один или более инвертированных лишенных азотистого основания остатков или инвертированных лишенных азотистого основания участков вставляют между нацеливающим лигандом и нуклеотидной последовательностью смысловой нити РНКи-агента. В некоторых вариантах осуществления включение одного или более инвертированных лишенных азотистого основания остатков или инвертированных лишенных азотистого основания участков в конец или концы смысловой нити РНКи-агента или вблизи их позволяет повысить активности или улучшить другие требуемые свойства РНКи-агента.

[0096] В некоторых вариантах осуществления один или более инвертированных лишенных азотистого основания остатков (invAb) добавляют к 5'-концу смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления один или более инвертированных лишенных азотистого основания остатков могут быть вставлены между нацеливающим лигандом и нуклеотидной последовательностью смысловой нити РНКи-агента. Инвертированные лишенные азотистого основания остатки могут быть связаны через фосфатные, фосфоротиоатные (например, показанные в настоящем документе как (invAb)s)) или иные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах осуществления включение одного или более инвертированных лишенных азотистого основания остатков в конец или концы смысловой нити РНКи-агента или вблизи их позволяет повысить активность или улучшить другие требуемые свойства РНКи-агента. В вариантах осуществления инвертированный лишенный основания (дезоксирибозный) остаток может быть заменен на инвертированный рибитный (лишенный азотистого основания рибозный) остаток. В некоторых вариантах осуществления 3'-конец последовательности сердцевинного участка антисмысловой нити или 3'-конец последовательности антисмысловой нити может включать в себя инвертированный лишенный азотистого основания остаток. Химические структуры инвертированных азотистого остатков дезоксирибозы лишенных основания представлены в приведенной ниже таблице 6.

20

5

10

15

РНКи-агенты против PNPLA3

[0097] Описываемые в настоящем документе РНКи-агенты против PNPLA3 разработаны для нацеливания на конкретные положения в гене PNPLA3 (например, в последовательности SEQ ID NO:1).

25

30

NM_025225.2 Содержащий пататин-подобный фосфолипазный домен белка 3 человека (PNPLA3), мPHK (SEQ ID NO: 1):

5

10

15

20

25

30

CTGCGTCGGCGTCCTCTCCGGTATCCCGCTGGAGCAGACTCTGCAGGTCCTCTCA ACTTAAGCAAGTTCCTCCGACAGGGTCTCTGCAAATGCCTCCCGGCCAATGTCCA CCAGCTCATCTCCGGCAAAATAGGCATCTCTCTTACCAGAGTGTCTGATGGGGAA AACGTTCTGGTGTCTGACTTTCGGTCCAAAGACGAAGTCGTGGATGCCTTGGTAT CGATATGTGGATGGAGGAGTGACTGACAACGTACCCTTCATTGATGCCAAAACA ACCATCACCGTGTCCCCCTTCTATGGGGAGTACGACATCTGCCCTAAAGTCAAGT CCACGAACTTTCTTCATGTGGACATCACCAAGCTCAGTCTACGCCTCTGCACAGG GAACCTCTACCTTCTCGAGAGCTTTTGTCCCCCGGATCTCAAGGTGCTGGGAG GGTCGCCATGCCCAGCTGGGCAAACATGAGTCTGGATTCTTCCCCGGAGTCGGCT GCCTTGGCTGTGAGGCTGGAGGGAGATGAGCTGCTAGACCACCTGCGTCTCAGCA TCCTGCCCTGGGATGAGAGCATCCTGGACACCCTCTCGCCCAGGCTCGCTACAGC ACTGAGTGAAGAAATGAAAGACAAAGGTGGATACATGAGCAAGATTTGCAACTT CTGCCATTGCGATTGTCCAGAGACTGGTGACATGGCTTCCAGATATGCCCGACGA TGTCCTGTGGTTGCAGTGGGTGACCTCACAGGTGTTCACTCGAGTGCTGATGTGTC TGCTCCCGCCTCCAGGTCCCAAATGCCAGTGAGCAGCCAACAGGCCTCCCCATG $\mathsf{CACACCTGAGCAGGACTGGCCCTGCTGGACTCCCTGCTCCCCAAGGGCTGTCCA}$ GCAGAGACCAAAGCAGAGCCACCCCGCGGTCCATCCTCAGGTCCAGCCTGAAC TTCTTCTTGGGCAATAAAGTACCTGCTGGTGCTGAGGGGCTCTCCACCTTTCCCAG TTTTTCACTAGAGAAGAGTCTGTGAGTCACTTGAGGAGGCGAGTCTAGCAGATTC TTTCAGAGGTGCTAAAGTTTCCCATCTTTGTGCAGCTACCTCCGCATTGCTGTA GTGACCCCTGCCTGTGACGTGGAGGATCCCAGCCTCTGAGCTGAGTTGGTTTTAT GAAAAGCTAGGAAGCAACCTTTCGCCTGTGCAGCGGTCCAGCACTTAACTCTAAT ACATCAGCATGCGTTAATTCAGCTGGTTGGGAAATGACACCAGGAAGCCCAGTGC AGAGGGTCCCTTACTGACTGTTTCGTGGCCCTATTAATGGTCAGACTGTTCCAGCA TGAGGTTCTTAGAATGACAGGTGTTTGGATGGGTGGGGGCCTTGTGATGGGGGGGT AGGCTGGCCCATGTGTGATCTTGTGGGGTGGAGGGAAGAGAATAGCATGATCCC ACTTCCCCATGCTGTGGGAAGGGGTGCAGTTCGTCCCCAAGAACGACACTGCCTG TCAGGTGGTCTGCAAAGATGATAACCTTGACTACTAAAAACGTCTCCATGGCGGG

5

10

15

20

25

30

[0098] Согласно используемому В настоящем документе определению, последовательность антисмысловой нити разработана для нацеливания на ген PNPLA3 в конкретном положении в гене, когда 5'-концевое нуклеотидное основание антисмысловой нити выравнено с положением, которое находится на 19 нуклеотидов дальше (в направлении к 3'-концу) от положения на гене при спаривании по основаниям с геном. Например, как показано в приведенных в настоящем документе таблицах 1 и 2, последовательность антисмысловой нити, разработанная для нацеливания на ген PNPLA3 в положении 2180, требует, чтобы при спаривании по основаниям с геном 5'-концевое нуклеотидное основание антисмысловой нити было выравнено с положением 2198 гена PNPLA3.

Как предложено в настоящем документе, РНКи-агент против PNPLA3 не требует, чтобы нуклеотидное основание в положении 1 (5' \rightarrow 3') антисмысловой нити было комплементарно гену, при наличии по меньшей мере 85% комплементарности (например, по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% комплементарности) антисмысловой нити И гена на последовательности сердцевинного участка из по меньшей мере 16 последовательных нуклеотидов. Например, для описываемого в настоящем документе РНКи-агента против PNPLA3, который разработан для нацеливания в положение 2180 гена PNPLA3, 5'-концевое нуклеотидное основание антисмысловой нити РНКи-агента против PNPLA3 должно быть выравнено с положением 2198 гена; однако 5'-концевое нуклеотидное основание антисмысловой нити может, но не обязательно должно, быть комплементарно положению 2200 гена PNPLA3, при наличии по меньшей мере 85% комплементарности (например, по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% комплементарности) антисмысловой нити и гена на протяжении последовательности сердцевинного участка из по меньшей мере 16 последовательных нуклеотидов. Как продемонстрировано, среди прочего, в различных описанных в настоящем документе примерах, конкретный сайт связывания с геном антисмысловой нити PHKи-агента против PNPLA3 (например, разработан ли PHKи-агент против PNPLA3 для нацеливания на ген PNPLA3 в положении 2180, в положении 1586, в положении 1179 или в каком-либо ином положении) важен для уровня ингибирования, достигаемого данным PHKи-агентом против PNPLA3.

[0100] В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе РНКи-агенты против PNPLA3 нацеливаются на ген PNPLA3 в положениях или вблизи положений генома PNPLA3, показанных в следующей таблице 1. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить PHКи-агента против PNPLA3, описанного в настоящем документе, включает в себя последовательность сердцевинного участка, которая полностью, по существу или по меньшей мере частично комплементарна целевой 19-мерной последовательности PNPLA3, описанной в таблице 1.

Таблица 1. 19-мерные целевые последовательности (взятые из пататин-подобного фосфолипазного домена человека белка 3 (PNPLA3) мРНК PNPLA3, мРНК, GenBank NM_025225.2 (SEQ ID NO:1))¹

SEQ ID No.	19-мерные целевые последовательности PNPLA3 $(5' o 3')$	Соответствующие положения последовательности SEQ ID NO: 1	Целевая позиция в гене (в соответствии с описанием)
2	ACCUUUUUCACCUAACUAA	2180–2198	2180
3	CUUUCCCAGUUUUUCACUA	1586–1604	1586
4	GGUGGAUACAUGAGCAAGA	1179–1197	1179
5	GGUCCAAAGACGAAGUCGU	571–589	571
6	AACGUACCCUUCAUUGAUG	687–705	687
7	CUGAGUUGGUUUUAUGAAA	1746–1764	1746
8	AGCAAGAUUUGCAACUUGC	1191–1209	1191

^{1.} В контексте положений в генах в настоящем документе автор изобретения использует Genebank NM_025225.2 в качестве эталонного гена для человеческого PNPLA3. Примерно 9 февраля 2020 г. последовательность гена была обновлена как NM_025225.3. С учетом обновленного гена изменится номер, указанный выше в

таблице 1 как «целевая позиция в гене», это не влияет на последовательности нуклеотидов, использованные в РНКи-агентах, описанных в настоящем документе.

[0101] В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 включает в себя антисмысловую нить, в которой положение 19 $(5'\rightarrow 3')$ способно формировать пару оснований с положением 1 19-мерной целевой последовательности, описанной в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 включает в себя антисмысловую нить, в которой положение 1 $(5'\rightarrow 3')$ способно формировать пару оснований с положением 19 19-мерной целевой последовательности, описанной в таблице 1.

5

10

15

20

25

30

[0102] В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 включает в себя антисмысловую нить, в которой положение 2 ($5'\rightarrow 3'$) способно формировать пару оснований с положением 18 19-мерной целевой последовательности, описанной в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 включает в себя антисмысловую нить, в которой положения 2–18 ($5'\rightarrow 3'$) способны формировать пары оснований с каждым из соответствующих комплементарных оснований, размещенных в положениях 18–2 19-мерной целевой последовательности, описанной в таблице 1.

[0103] В отношении РНКи-агентов, описанных в настоящем документе, нуклеотид в положении 1 антисмысловой нити (от 5'-конца \rightarrow к 3'-концу) может быть абсолютно комплементарным гену PNPLA3 или может быть не комплементарным гену PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 антисмысловой нити (от 5'-конца \rightarrow к 3'-концу) представляет собой U, A или dT. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 антисмысловой нити (от 5'-конца \rightarrow к 3'-концу) образует со смысловой нитью пару оснований A:U или U:A.

[0104] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить РНКи-агента против PNPLA3 содержит последовательность нуклеотидов (от 5'-конца \rightarrow к 3'-концу) 2–18, 2–19, 2–20 или 2–21 любой из последовательностей антисмысловой нити из таблицы 2 или таблицы 3. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить РНКи-агента против PNPLA3 содержит последовательность нуклеотидов (от 5'-конца \rightarrow к 3'-концу) 3–21, 2–21, 1–21, 3–20, 2–20, 1–20, 3–19, 2–19, 1–19, 3–18, 2–18 или 1–18 любой из последовательностей смысловой нити из таблицы 2 или таблицы 4.

[0105] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить РНКи-агента против PNPLA3 содержит последовательность нуклеотидов (от 5'-конца → к 3'-концу)

2–18, 2–19, 2–20 или 2–21 любой из последовательностей антисмысловой нити SEQ ID NO: 46–60, 176, 181 и 188. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить РНКи-агента против PNPLA3 содержит последовательность нуклеотидов (от 5'-конца \rightarrow к 3'-концу) 3–21, 2–21, 1–21, 3–20, 2–20, 1–20, 3–19, 2–19, 1–19, 3–18, 2–18 или 1–18 любой из последовательностей смысловой нити SEQ ID NO: 2, 3, 4, 9–20, 214, 219 и 220.

5

10

15

20

[0106] В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 включает в себя (i) антисмысловую нить, содержащую последовательность нуклеотидов (от 5'-конца \rightarrow к 3'-концу) 2–18 или 2–19 любой из последовательностей антисмысловой нити из таблицы 2 или таблицы 3, и (ii) смысловую нить, содержащую последовательность нуклеотидов (от 5'-конца \rightarrow к 3'-концу) 3–21, 2–21, 1–21, 3–20, 2–20, 1–20, 3–19, 2–19, 1–19, 3–18, 2–18 или 1–18 любой из последовательностей смысловой нити из таблицы 2 или таблицы 4.

[0107] В некоторых вариантах осуществления (i) антисмысловая нить РНКи-агента против PNPLA3 содержит последовательность нуклеотидов (от 5'-конца \rightarrow к 3'-концу) 2–18 или 2–19 любой из последовательностей антисмысловой нити SEQ ID NO: 46–60, 176, 181 и 188, и (ii) смысловая нить содержит последовательность нуклеотидов (от 5'-конца \rightarrow к 3'-концу) 3–21, 2–21, 1–21, 3–20, 2–20, 1–20, 3–19, 2–19, 1–19, 3–18, 2–18 или 1–18 любой из последовательностей смысловой нити SEQ ID NO: 2, 3, 4, 9–20, 214, 219 и 220.

[0108] В некоторых вариантах осуществления РНКи-агенты против PNPLA3 включают в себя сердцевинные 19-мерные нуклеотидные последовательности, показанные в следующей таблице 2.

Таблица 2. Антисмысловая нить РНКи-агента против PNPLA3 и последовательности сердцевинного участка смысловой нити $(N = \text{любое нуклеотидное основание}; I = \text{гипоксантин (инозиновый нуклеотид; } (A^{2N}) = 2$ -аминоадениновый нуклеотид)

SEQ ID No.	Последовательность антисмысловой нити $(5' \to 3')$ (показана как немодифицированная нуклеотидная последовательность)	SEQ ID No.	Последовательность смысловой нити $(5' \to 3')$ (показана как немодифицированная нуклеотидная последовательность)	Соответствующие положения идентифицированной последовательности SEQ ID NO: 1	Целевая позиция в гене
46	UUAGUUAGGUGAAAAAGGU	2	ACCUUUUUCACCUAACUAA	2180–2198	2180
47	NUAGUUAGGUGAAAAAGGU	9	ACCUUUUUCACCUAACUAN	2180–2198	2180
48	NUAGUUAGGUGAAAAAGGN	10	NCCUUUUUCACCUAACUAN	2180–2198	2180
49	UUAGUUAGGUGAAAAAGGU	11	ACCUUUUUCACCUAACU(A ^{2N})A	2180–2198	2180
50	NUAGUUAGGUGAAAAAGGU	12	ACCUUUUUCACCUAACU(A ^{2N})N	2180–2198	2180
51	NUAGUUAGGUGAAAAAGGN	13	NCCUUUUUCACCUAACU(A ^{2N})N	2180–2198	2180
52	UAGUGAAAAACUGGGAAAG	3	CUUUCCCAGUUUUUCACUA	1586–1604	1586
53	NAGUGAAAAACUGGGAAAG	14	CUUUCCCAGUUUUUCACUN	1586–1604	1586
54	NAGUGAAAAACUGGGAAAN	15	NUUUCCCAGUUUUUCACUN	1586–1604	1586
55	UCUUGCUCAUGUAUCCACC	4	GGUGGAUACAUGAGCAAGA	1179–1197	1179
56	NCUUGCUCAUGUAUCCACC	16	GGUGGAUACAUGAGCAAGN	1179–1197	1179
57	NCUUGCUCAUGUAUCCACN	17	NGUGGAUACAUGAGCAAGN	1179–1197	1179
58	UCUUGCUCAUGUAUCCACC	18	GGUGGAUACAUGAICAAGA	1179–1197	1179
59	NCUUGCUCAUGUAUCCACC	19	GGUGGAUACAUGAICAAGN	1179–1197	1179
60	NCUUGCUCAUGUAUCCACN	20	NGUGGAUACAUGAICAAGN	1179–1197	1179
61	ACGACUUCGUCUUUGGACC	5	GGUCCAAAGACGAAGUCGU	571–589	571
62	UCGACUUCGUCUUUGGACC	21	GGUCCAAAGACGAAGUCGA	571–589	571
63	NCGACUUCGUCUUUGGACC	22	GGUCCAAAGACGAAGUCGN	571–589	571
64	NCGACUUCGUCUUUGGACN	23	NGUCCAAAGACGAAGUCGN	571–589	571
65	ACGACUUCGUCUUUGGACC	24	GGUCCAAAGACGAAGUCIU	571–589	571
66	UCGACUUCGUCUUUGGACC	25	GGUCCAAAGACGAAGUCIA	571–589	571
67	NCGACUUCGUCUUUGGACC	26	GGUCCAAAGACGAAGUCIN	571–589	571
68	NCGACUUCGUCUUUGGACN	27	NGUCCAAAGACGAAGUCIN	571–589	571
69	ACGACUUCGUCUUUGGACC	28	GGUCCAAAGACIAAGUCIU	571–589	571
70	UCGACUUCGUCUUUGGACC	29	GGUCCAAAGACIAAGUCIA	571–589	571

71	NCGACUUCGUCUUUGGACC	30	GGUCCAAAGACIAAGUCIN	571–589	571
72	NCGACUUCGUCUUUGGACN	31	NGUCCAAAGACIAAGUCIN	571–589	571
73	ACGACUUCGUCUUUGGACC	32	GGUCCAAAGACGAAIUCGU	571–589	571
74	UCGACUUCGUCUUUGGACC	33	GGUCCAAAGACGAAIUCGA	571–589	571
75	NCGACUUCGUCUUUGGACC	34	GGUCCAAAGACGAAIUCGN	571–589	571
76	NCGACUUCGUCUUUGGACN	35	NGUCCAAAGACGAAIUCGN	571–589	571
257	CAUCAAUGAAGGGUACGUU	6	AACGUACCCUUCAUUGAUG	687–705	687
78	UAUCAAUGAAGGGUACGUU	36	AACGUACCCUUCAUUGAUA	687–705	687
77	NAUCAAUGAAGGGUACGUU	37	AACGUACCCUUCAUUGAUN	687–705	687
79	NAUCAAUGAAGGGUACGUN	38	NACGUACCCUUCAUUGAUN	687–705	687
258	UUUCAUAAAACCAACUCAG	7	CUGAGUUGGUUUUAUGAAA	1746–1764	1746
80	NUUCAUAAAACCAACUCAG	39	CUGAGUUGGUUUUAUGAAN	1746–1764	1746
81	NUUCAUAAAACCAACUCAN	40	NUGAGUUGGUUUUAUGAAN	1746–1764	1746
82	GCAAGUUGCAAAUCUUGCU	8	AGCAAGAUUUGCAACUUGC	1191–1209	1191
83	UCAAGUUGCAAAUCUUGCU	41	AGCAAGAUUUGCAACUUGA	1191–1209	1191
84	UCAAGUUGCAAAUCUUGCG	42	CGCAAGAUUUGCAACUUGA	1191–1209	1191
85	NCAAGUUGCAAAUCUUGCU	43	AGCAAGAUUUGCAACUUGN	1191–1209	1191
86	NCAAGUUGCAAAUCUUGCG	44	CGCAAGAUUUGCAACUUGN	1191–1209	1191
87	NCAAGUUGCAAAUCUUGCN	45	NGCAAGAUUUGCAACUUGN	1191–1209	1191

[0109] Смысловые нити и антисмысловые нити РНКи-агента против PNPLA3, которые содержат или состоят из нуклеотидных последовательностей из таблицы 2, могут быть модифицированными нуклеотидами или немодифицированными нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агенты против PNPLA3, имеющие последовательности смысловой и антисмысловой нитей, которые содержат или состоят из нуклеотидных последовательностей из таблицы 2, полностью или по существу полностью состоят из модифицированных нуклеотидов.

[0110] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить РНКи-агента против PNPLA3, описанного в настоящем документе, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей антисмысловой нити, приведенных в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить РНКи-агента против PNPLA3, описанного в настоящем документе, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей антисмысловой нити SEQ ID NO: 46–60, 176, 181 и 188. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить РНКи-агента против PNPLA3, описанного в настоящем документе, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей смысловой нити, приведенных в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить РНКи-агента против PNPLA3, описанного в настоящем документе, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей смысловой нити SEQ ID NO: 2, 3, 4, 9–20, 214, 219 и 220.

[0111] В настоящем документе каждый N, перечисленный в последовательности, показанной в таблице 2, может быть независимо выбран из любого или всех нуклеотидных оснований (включая присутствующие на модифицированных и немодифицированных нуклеотидах). В некоторых вариантах осуществления N нуклеотид, перечисленный в последовательности, показанной в таблице 2, имеет нуклеотидное основание, которое комплементарно N нуклеотиду в соответствующем положении на другой нити. В некоторых вариантах осуществления N нуклеотидное основание, которое не комплементарно N нуклеотиду в соответствующем положении на другой нити. В некоторых вариантах осуществления N нуклеотид, перечисленный в последовательности, показанной в таблице 2, имеет такое же нуклеотидное основание, что и у N нуклеотида в соответствующем положении на другой нити. В некоторых вариантах осуществления N нуклеотид, перечисленный в последовательности, показанной в таблице 1, перечисленный в последовательности, показанной в таблице 2, имеет такое же нуклеотидное основание, что и у N нуклеотида в соответствующем положении на другой нити. В некоторых вариантах осуществления N нуклеотид, перечисленный в последовательности,

показанной в таблице 2, имеет отличное нуклеотидное основание по отношению к N нуклеотиду в соответствующем положении на другой нити.

[0112] Модифицированные последовательности антисмысловой нити РНКи-агента против PNPLA3, а также их исходные немодифицированные последовательности представлены в таблице 3. Модифицированные последовательности смысловой нити РНКи-агента против PNPLA3, а также их исходные немодифицированные последовательности представлены в таблице 4. При формировании РНКи-агентов против PNPLA3 каждый из нуклеотидов в каждой из немодифицированных последовательностей, перечисленных в таблицах 3 и 4, а также в таблице 2 выше, может представлять собой модифицированный нуклеотид.

5

10

15

20

25

30

[0113] РНКи-агенты против PNPLA3, описанные в настоящем документе, получают путем отжига антисмысловой нити и смысловой нити. Смысловая нить, содержащая последовательность, приведенную в таблице 2 или таблице 4, может быть гибридизирована с любой антисмысловой нитью, содержащей последовательность, приведенную в таблице 2 или таблице 3, при условии, что две последовательности имеют область, на по меньшей мере 85% комплементарную непрерывной нуклеотидной последовательности из 16, 17, 18, 19, 20 или 21 нуклеотида.

[0114] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить РНКи-агента против PNPLA3 содержит любую из нуклеотидных последовательностей, представленных в таблице 2 или таблице 3.

[0115] В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 содержит или состоит из дуплекса с нуклеотидными последовательностями смысловой нити и антисмысловой нити любой из последовательностей из таблицы 2, таблицы 3 или таблицы 4. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 содержит или состоит из дуплексной последовательности SEQ ID NO: (176 и 214); (90 и 131); (181 и 219); (95 и 136); (188 и 220) и/или (102 и 137). В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 содержит дуплексную последовательность SEQ ID NO: (176 и 214); (90 и 131); (181 и 219); (95 и 136); (188 и 220) или (102 и 137), его получают или предлагают в виде соли, смешанной соли или свободной кислоты.

[0116] Примеры антисмысловых нитей, содержащих модифицированные нуклеотиды, показаны в таблице 3. Примеры смысловых нитей, содержащих модифицированные нуклеотиды, показаны в таблице 4.

[0117] В настоящем документе (как показано в таблицах 3 и 4) для обозначения модифицированных нуклеотидов и связующих групп используются следующие условные знаки.

A аденозин-3'-фосфат; C цитидин-3'-фосфат; 5 G гуанозин-3'-фосфат; U уридин-3'-фосфат Ι инозин-3'-фосфат 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат a 2'-О-метиладенозин-3'-фосфоротиоат 10 as 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат c 2'-О-метилцитидин-3'-фосфоротиоат cs 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат g 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфоротиоат gs 2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат 15 t 2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат ts 2'-О-метилуридин-3'-фосфат u 2'-О-метилуридин-3'-фосфоротиоат us 2'-О-метилинозин-3'-фосфат i 2'-О-метилинозин-3'-фосфоротиоат is 20 Af 2'-фтораденозин-3'-фосфат 2'-фтораденозин-3'-фосфоротиоат Afs Cf 2'-фторцитидин-3'-фосфат Cfs 2'-фторцитидин-3'-фосфоротиоат 25 Gf 2'-фторгуанозин-3'-фосфат 2'-фторгуанозин-3'-фосфоротиоат Gfs Tf 2'-фтор-5'-метилуридин-3'-фосфат 2'-фтор-5'-метилуридин-3'-фосфоротиоат Tfs Uf 2'-фторуридин-3'-фосфат Ufs 2'-фторуридин-3'-фосфоротиоат 30 2',3'-секо-аденозин-3'-фосфат, см. таблицу 6 A_{UNA} 2',3'-секо-аденозин-3'-фосфоротиоат, см. таблицу 6 Aunas = 2',3'-секо-цитидин-3'-фосфат, см. таблицу 6 C_{UNA} = 2',3'-секо-цитидин-3'-фосфоротиоат, см. таблицу 6 CUNAS 2',3'-секо-гуанозин-3'-фосфат, см. таблицу 6 35 G_{UNA} GUNAS = 2',3'-секо-гуанозин-3'-фосфоротиоат, см. таблицу 6 = 2',3'-секо-уридин-3'-фосфат, см. таблицу 6 U_{UNA} UIINAS = 2',3'-секо-уридин-3'-фосфоротиоат, см. таблицу 6 2'-О-метил-2-аминоаденозин-3'-фосфат, см. таблицу 6 a 2N 2'-О-метил-2-аминоаденозин-3'-фосфоротиоат, см. таблицу 6 a 2Ns 40

(invAb) = инвертированный лишенный азотистого основания дезоксирибонуклеотид, см. таблицу 6

5

10

15

20

25

30

(invAb)s = инвертированный лишенный азотистого основания дезоксирибонуклеотид-5'-фосфоротиоат, см. таблицу 6

[0118]Как будет сразу понятно среднему специалисту в данной области, если в последовательности не указано иное (например с помощью фосфоротиоатной связи s), мономеры нуклеотида, при наличии в олигонуклеотиде, взаимно соединены 5'-3'фосфодиэфирными связями. Обычный специалист в данной области легко поймет, что включение фосфоротиоатной связи, как показано в контексте модифицированных нуклеотидных последовательностей, показанных в настоящем документе, замещает фосфодиэфирные связи, обычно присутствующую в олигонуклеотидах. Среднему специалисту в данной области сразу будет понятно, что концевой нуклеотид на 3'конце данной олигонуклеотидной последовательности, как правило, будет иметь гидроксильную (-ОН) группу в соответствующем 3'-положении данного мономера вместо фосфатной группы ex vivo. Кроме того, в контексте вариантов осуществления, представленных в настоящем документе, при рассмотрении соответствующей нити 5' → 3' инвертированные лишенные азотистого основания остатки вставлены таким образом, что 3'-положение дезоксирибозы связано с 3'-концом предшествующего мономера на соответствующей нити (см, например, таблицу 6). Более того, средний специалист в данной области легко поймет и оценит, что хотя фосфоротиоатные химические структуры, показанные в настоящем документе, как правило, имеют анион на атоме серы, в состав представленного в настоящем документе изобретения входят все фосфоротиоатные таутомеры (например, где атом серы имеет двойную связь, а анион расположен на атоме кислорода). Если в настоящем документе прямо не указано иное, такое понимание среднего специалиста в данной области используется при описании РНКи-агентов против PNPLA3 и композиций РНКи-агентов против PNPLA3, описанных в настоящем документе.

[0119] Определенные примеры нацеливающих лигандов, нацеливающих групп и связующих групп, используемых в РНКи-агентах против PNPLA3, описанных в настоящем документе, представлены ниже в таблице 6. Более конкретно, нацеливающие группы и связующие группы (которые вместе могут формировать нацеливающий лиганд) включают (NAG37) и (NAG37)s, а их химические структуры представлены ниже в таблице 6. Каждая смысловая нить и/или антисмысловая нить

могут иметь нацеливающие лиганды, нацеливающие группы или связующие группы, перечисленные в настоящем документе, а также другие группы, конъюгированные на 5′ и/или 3′ конце последовательности.

Таблица 3. Последовательности антисмысловой нити РНКи-агента против PNPLA3

Идентификатор антисмысловой нити	Модифицированная антисмысловая нить $(5' o 3')$	SEQ ID NO:	Немодифицированная последовательность $(5' o 3')$	SEQ ID NO:
			(показана как немодифицированная нуклеотидная последовательность)	
J1M00002-AS	usCfsasUfcAfaUfgAfaGfgGfuAfcGfuUfsg	88	UCAUCAAUGAAGGGUACGUUG	174
J1M00004-AS	usCfsasUfcAfaUfgAfaGfgGfuAfcGfuCfsg	89	UCAUCAAUGAAGGGUACGUCG	175
J1M00006-AS	usAfsgsUfgAfaAfaAfcUfgGfgAfaAfgGfsu	90	UAGUGAAAAACUGGGAAAGGU	176
J1M00008-AS	usAfsgsUfgAfaAfaAfcUfgGfgAfaAfgGfsg	91	UAGUGAAAAACUGGGAAAGGG	177
J1M00010-AS	asAfsasUfcUfuGfcUfcAfuGfuAfuCfcAfsc	92	AAAUCUUGCUCAUGUAUCCAC	178
J1M00012-AS	usAfscsUfuGfaCfuUfuAfgGfgCfaGfaUfsg	93	UACUUGACUUUAGGGCAGAUG	179
J1M00014-AS	usAfscsUfuGfaCfuUfuAfgGfgCfaGfaCfsg	94	UACUUGACUUUAGGGCAGACG	180
J1M00016-AS	usUfsasGfuUfaGfgUfgAfaAfaAfgGfuGfsu	95	UUAGUUAGGUGAAAAAGGUGU	181
J1M00020-AS	usCfsusUfgCfuCfaUfgUfaUfcCfaCfcUfsg	96	UCUUGCUCAUGUAUCCACCUG	182
J1M00023-AS	asCfsgsAfcUfuCfgUfcUfuUfgGfaCfcGfsa	97	ACGACUUCGUCUUUGGACCGA	183
J1M00025-AS	usAfsusCfaAfuGfaAfgGfgUfaCfgUfuGfsg	98	UAUCAAUGAAGGGUACGUUGG	184
J1M00027-AS	usCfscsAfaAfuAfuCfcUfcGfaAfgGfcAfsg	99	UCCAAAUAUCCUCGAAGGCAG	185
J1M00029-AS	usUfsgsAfaAfaAfcUfgGfgAfaAfgGfuGfsg	100	UUGAAAAACUGGGAAAGGUGG	186
J1M00031-AS	usUfscsAfuAfaAfaCfcAfaCfuCfaGfcUfsc	101	UUCAUAAAACCAACUCAGCUC	187
J1M00032-AS	$us Cf sus Ufg Cf U_{UNA} Cf a Ufg Ufa Ufc Cf a Cf c Ufsg \\$	102	UCUUGCUCAUGUAUCCACCUG	188
J1M00034-AS	$as Gfs as Afc Gf U_{UNA} Ufu Ufc Cfc Cfa Ufc Afg Afsc \\$	103	AGAACGUUUUCCCCAUCAGAC	189
J1M00036-AS	asGfsasAfcGfU _{UNA} UfuUfcCfcCfaUfcAfgusu	104	AGAACGUUUUCCCCAUCAGUU	190
J1M00038-AS	usAfscsAfcCfagaacGfuUfuUfcCfcCfsa	105	UACACCAGAACGUUUUCCCCA	191
J1M00040-AS	$us G f s as A f a G f U_{UNA} C f a G f a C f c A f g A f a C f s g \\$	106	UGAAAGUCAGACACCAGAACG	192
J1M00042-AS	$us A fs as Gfg Gf U_{UNA} A fc Gfu Ufg Ufc A fc Ufc A fs c$	107	UAAGGGUACGUUGUCACUCAC	193
J1M00046-AS	usAfscsUfuUfagggcAfgAfuGfuCfgUfsg	108	UACUUUAGGGCAGAUGUCGUG	194
J1M00050-AS	usGfsusAfgCfaAfgUfuGfcAfaAfuCfuCfsg	109	UGUAGCAAGUUGCAAAUCUCG	195
J1M00052-AS	$as Cfsgs Afc Uf U_{UNA} Cfg Ufc Ufu Ufg Gfa Cfc Gfs a\\$	110	ACGACUUCGUCUUUGGACCGA	196

Идентификатор антисмысловой	Модифицированная антисмысловая нить $(5' o 3')$	SEQ ID NO:	Немодифицированная последовательность	SEQ ID NO:
нити	(c)		$(5' \rightarrow 3')$	1,00
			(показана как немодифицированная	
			нуклеотидная последовательность)	
J1M00057-AS	asCfsasAfgAfuCfuGfaGfaGfgAfcCfuGfsc	111	ACAAGAUCUGAGAGGACCUGC	197
J1M00059-AS	usCfsasAfuGfaAfgGfgUfaCfgUfuGfuCfsg	112	UCAAUGAAGGGUACGUUGUCG	198
J1M00063-AS	asAfsusCfuUfgCfuCfaUfgUfaUfcCfaCfsc	113	AAUCUUGCUCAUGUAUCCACC	199
J1M00072-AS	usUfsgsUfcAfuUfuCfcCfaAfcCfaGfcUfsg	114	UUGUCAUUUCCCAACCAGCUG	200
J1M00074-AS	usAfsgsUfgAfaAfaAfcUfgGfgAfaAfgGfsc	115	UAGUGAAAAACUGGGAAAGGC	201
J1M00077-AS	usCfsusUfgCfuCfaUfgUfaUfcCfaCfcUfsu	116	UCUUGCUCAUGUAUCCACCUU	202
J1M00079-AS	usCfsusUfgCfuCfaUfgUfaUfcCfaCfcUfsc	117	UCUUGCUCAUGUAUCCACCUC	203
J1M00082-AS	usUfsasGfuUfaGfgUfgAfaAfaAfgGfuGfsc	118	UUAGUUAGGUGAAAAAGGUGC	204
J1M00113-AS	c Prpus Ufs as Gfu Ufa Gfg Ufg Afa Afa Afg Gfu Gfs u	119	UUAGUUAGGUGAAAAAGGUGU	205
J1M00114-AS	$us Uf sas G fu U_{UNA} a G fg Uf g A fa A fa A fg G fu G fs u \\$	120	UUAGUUAGGUGAAAAAGGUGU	205
J1M00115-AS	$us Uf sas G fu Uf A_{UNA} G fg Ufg Afa Afa Afg G fu G fs u\\$	121	UUAGUUAGGUGAAAAAGGUGU	205
J1M00116-AS	usUfsasGfuUfaG _{UNA} gUfgAfaAfaAfgGfuGfsu	122	UUAGUUAGGUGAAAAAGGUGU	205
J1M00121-AS	asUfscsCfaAfaUfaUfcCfuCfgAfaGfgCfsa	123	AUCCAAAUAUCCUCGAAGGCA	206
J1M00123-AS	usCfsasUfgUfaUfcCfaCfcUfuUfgUfcUfsu	124	UCAUGUAUCCACCUUUGUCUU	207
J1M00125-AS	usGfscsAfaAfuCfuUfgCfuCfaUfgUfaUfsc	125	UGCAAAUCUUGCUCAUGUAUC	208
J1M00127-AS	usCfsasAfgUfuGfcAfaAfuCfuUfgCfuCfsa	126	UCAAGUUGCAAAUCUUGCUCA	209
J1M00129-AS	usCfsasAfgUfuGfcAfaAfuCfuUfgCfuCfsg	127	UCAAGUUGCAAAUCUUGCUCG	210
J1M00133-AS	usUfsusCfaUfaAfaAfcCfaAfcUfcAfgCfsu	128	UUUCAUAAAACCAACUCAGCU	211

Таблица 4. Последовательности смысловой нити РНКи-агента против PNPLA3

ИД смысловой нити:	Модифицированная смысловая нить (5 $^\prime$ $ ightarrow$ 3 $^\prime$)	SEQ ID NO:	Немодифицированная последовательность $(5' \rightarrow 3')$	SEQ ID NO:
			(показана как	
			немодифицированная нуклеотидная последовательность)	
J1M00001-SS	(NAG37)s(invAb)scaacguacCfCfUfucauugaugas(invAb)	129	CAACGUACCCUUCAUUGAUGA	212
J1M00003-SS	(NAG37)s(invAb)scgacguacCfCfUfucauugaugas(invAb)	130	CGACGUACCCUUCAUUGAUGA	213
J1M00005-SS	(NAG37)s(invAb)saccuuuccCfAfGfuuuuucacuas(invAb)	131	ACCUUUCCCAGUUUUUCACUA	214
J1M00007-SS	(NAG37)s(invAb)scccuuuccCfAfGfuuuuucacuas(invAb)	132	CCCUUUCCCAGUUUUUCACUA	215
J1M00009-SS	(NAG37)s(invAb)sguggauacAfUfGfagcaagauuus(invAb)	133	GUGGAUACAUGAGCAAGAUUU	216
J1M00011-SS	(NAG37)s(invAb)scaucugccCfUfAfaagucaaguas(invAb)	134	CAUCUGCCCUAAAGUCAAGUA	217
J1M00013-SS	(NAG37)s(invAb)scgucugccCfUfAfaagucaaguas(invAb)	135	CGUCUGCCCUAAAGUCAAGUA	218
J1M00015-SS	(NAG37)s(invAb)sacaccuuuUfUfCfaccuaacuaas(invAb)	136	ACACCUUUUUCACCUAACUAA	219
J1M00019-SS	(NAG37)s(invAb)scagguggaUfAfCfaugagcaagas(invAb)	137	CAGGUGGAUACAUGAGCAAGA	220
J1M00021-SS	(NAG37)s(invAb)scagguggaUfAfCfaugaicaagas(invAb)	138	CAGGUGGAUACAUGAICAAGA	221
J1M00022-SS	(NAG37)s(invAb)sucgguccaAfAfGfacgaagucius(invAb)	139	UCGGUCCAAAGACGAAGUCIU	222
J1M00024-SS	(NAG37)s(invAb)sccaacguaCfCfCfuucauugauas(invAb)	140	CCAACGUACCCUUCAUUGAUA	223
J1M00026-SS	(NAG37)s(invAb)scugccuucGfAfGfgauauuuigas(invAb)	141	CUGCCUUCGAGGAUAUUUIGA	224
J1M00028-SS	(NAG37)s(invAb)sccaccuuuCfCfCfaguuuuucaas(invAb)	142	CCACCUUUCCCAGUUUUUCAA	225
J1M00030-SS	(NAG37)s(invAb)sgagcugagUfUfGfguuuuaugaas(invAb)	143	GAGCUGAGUUGGUUUUAUGAA	226
J1M00033-SS	(NAG37)s(invAb)sgucugaugGfGfGfaaaacguucus(invAb)	144	GUCUGAUGGGGAAAACGUUCU	227
J1M00035-SS	(NAG37)s(invAb)scugaugGfGfGfaaaacguucuuus(invAb)	145	CUGAUGGGGAAAACGUUCUUU	228
J1M00037-SS	(NAG37)s(invAb)suggggaaaAfCfGfuucugiuguas(invAb)	146	UGGGGAAAACGUUCUGIUGUA	229
J1M00039-SS	(NAG37)s(invAb)scguucuggUfGfUfcugacuuucas(invAb)	147	CGUUCUGGUGUCUGACUUUCA	230

ИД смысловой нити:	Модифицированная смысловая нить (5 $^{\prime} ightarrow 3^{\prime}$)	SEQ ID NO:	Немодифицированная последовательность (5' → 3') (показана как немодифицированная нуклеотидная последовательность)	SEQ ID NO:
J1M00041-SS	(NAG37)s(invAb)sgugagugaCfAfAfcguacccuuas(invAb)	148	GUGAGUGACAACGUACCCUUA	231
J1M00045-SS	(NAG37)s(invAb)scacgacauCfUfGfcccuaaaguas(invAb)	149	CACGACAUCUGCCCUAAAGUA	232
J1M00049-SS	(NAG37)s(invAb)scgagauuuGfCfAfacuuicuacas(invAb)	150	CGAGAUUUGCAACUUICUACA	233
J1M00051-SS	(NAG37)s(invAb)sucgguccaAfAfGfacgaagucgus(invAb)	151	UCGGUCCAAAGACGAAGUCGU	234
J1M00053-SS	(NAG37)s(invAb)sucgguccaAfAfGfacgaaiucgus(invAb)	152	UCGGUCCAAAGACGAAIUCGU	235
J1M00054-SS	(NAG37)s(invAb)sccaccuuuUfUfCfaccuaacua_2Nas(invAb)	153	CCACCUUUUUCACCUAACU(A ^{2N}) A	236
J1M00056-SS	(NAG37)s(invAb)sgcagiuccUfCfUfcagaucuugus(invAb)	154	GCAGIUCCUCUCAGAUCUUGU	237
J1M00058-SS	(NAG37)s(invAb)scgacaacgUfAfCfccuucauugas(invAb)	155	CGACAACGUACCCUUCAUUGA	238
J1M00062-SS	(NAG37)s(invAb)sgguggauaCfAfUfgagcaagauus(invAb)	156	GGUGGAUACAUGAGCAAGAUU	239
J1M00071-SS	(NAG37)s(invAb)scagcugguUfGfGfgaaaugacaas(invAb)	157	CAGCUGGUUGGGAAAUGACAA	240
J1M00073-SS	(NAG37)s(invAb)sgccuuuccCfAfGfuuuuucacuas(invAb)	158	GCCUUUCCCAGUUUUUCACUA	241
J1M00076-SS	(NAG37)s(invAb)saagguggaUfAfCfaugaicaagas(invAb)	159	AAGGUGGAUACAUGAICAAGA	242
J1M00078-SS	(NAG37)s(invAb)sgagguggaUfAfCfaugaicaagas(invAb)	160	GAGGUGGAUACAUGAICAAGA	243
J1M00080-SS	(NAG37)s(invAb)sa_2NagguggaUfAfCfaugaicaagas(invAb)	161	(A ^{2N})AGGUGGAUACAUGAICAAG A	244
J1M00081-SS	(NAG37)s(invAb)sguggacuuCfUfCfucaauuuucus(invAb)	162	GCACCUUUUUCACCUAACUAA	245
J1M00083-SS	(NAG37)s(invAb)sgcaccuuuUfUfCfaccuaacua_2Nas(invAb)	163	GCACCUUUUUCACCUAACUAA	246
J1M00084-SS	(NAG37)s(invAb)sa_2NcaccuuuUfUfCfaccuaacuaas(invAb)	164	(A ^{2N})CACCUUUUUCACCUAACUA A	247
J1M00117-SS	(NAG37)s(invAb)sacaccuuuUfUfCfaccuaacua_2Nas(invAb)	165	ACACCUUUUUCACCUAACU(A ^{2N})	248

ИД смысловой нити:	Модифицированная смысловая нить (5' $ ightarrow$ 3')	SEQ ID NO:	Немодифицированная последовательность (5' → 3') (показана как немодифицированная нуклеотидная последовательность)	SEQ ID NO:
			A	
J1M00118-SS	(NAG37)s(invAb)sa_2NcaccuuuUfUfCfaccuaacua_2Nas(invAb)	166	(A ^{2N})CACCUUUUUCACCUAACUA A	249
J1M00119-SS	(NAG37)s(invAb)sacAfcCfuUfuUfUfCfaccuaacuaas(invAb)	167	ACACCUUUUUCACCUAACUAA	250
J1M00120-SS	(NAG37)s(invAb)sugccuucgAfGfGfauauuuggaus(invAb)	168	UGCCUUCGAGGAUAUUUGGAU	251
J1M00122-SS	(NAG37)s(invAb)sa_2NagacaaaGfGfUfggauacaugas(invAb)	169	(A ^{2N})AGACAAAGGUGGAUACAUG A	252
J1M00124-SS	(NAG37)s(invAb)sga_2NuacaugAfGfCfaagauuugcas(invAb)	170	G(A ^{2N})UACAUGAGCAAGAUUUGC A	253
J1M00126-SS	(NAG37)s(invAb)sugagcaagAfUfUfugcaacuugas(invAb)	171	UGAGCAAGAUUUGCAACUUGA	254
J1M00128-SS	(NAG37)s(invAb)scgagcaagAfUfUfugcaacuugas(invAb)	172	CGAGCAAGAUUUGCAACUUGA	255
J1M00132-SS	(NAG37)s(invAb)sagcugaguUfGfGfuuuuaugaaas(invAb)	173	AGCUGAGUUGGUUUUAUGAAA	256

 $[\]overline{(A^{2N})}$ = 2-аминоадениновый нуклеотид; I = гипоксантин (инозиновый) нуклеотид

[0120] РНКи-агенты против PNPLA3, описанные в настоящем документе, получают посредством отжига антисмысловой нити и смысловой нити. Смысловая нить, содержащая последовательность, приведенную в таблице 2 или таблице 4, может быть гибридизирована с любой антисмысловой нитью, содержащей последовательность, приведенную в таблице 2 или таблице 3, при условии, что две последовательности имеют область, на по меньшей мере 85% комплементарную непрерывной нуклеотидной последовательности из 16, 17, 18, 19, 20 или 21 нуклеотида.

5

10

15

20

25

30

[0121] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить РНКи-агента против PNPLA3, описанного в настоящем документе, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей антисмысловой нити, приведенных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить РНКи-агента против PNPLA3, описанного в настоящем документе, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей смысловой нити, приведенных в таблице 4.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить РНКи-агента [0122] против PNPLA3 содержит любую ИЗ нуклеотидных последовательностей, представленных в таблице 2 или таблице 3. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить РНКи-агента против PNPLA3 содержит последовательность нуклеотидов (от 5'-конца \rightarrow к 3'-концу) 1–17, 2–17, 1–18, 2–18, 1–19, 2–19, 1–20, 2–20, 1-21 или 2-21 любой из последовательностей, представленных в таблице 2 или таблице 3. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить РНКи-агента против PNPLA3 содержит или состоит из модифицированной последовательности, представляющей собой любую модифицированных ИЗ последовательностей, представленных в таблице 3.

[0123] В некоторых вариантах осуществления смысловая нить РНКи-агента против PNPLA3 содержит любую из нуклеотидных последовательностей, представленных в таблице 2 или таблице 4. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить РНКи-агента против PNPLA3 содержит последовательность нуклеотидов (от 5'-конца \rightarrow к 3'-концу) 1–17, 2–17, 3–17, 4–17, 1–18, 2–18, 3–18, 4–18, 1–19, 2–19, 3–19, 4–19, 1–20, 2–20, 3–20, 4–20, 1–21, 2–21, 3–21 или 4–21 любой из последовательностей, представленных в таблице 2 или таблице 4. В определенных вариантах осуществления смысловая нить РНКи-агента против PNPLA3 содержит или состоит из любой из модифицированных последовательностей, представленных в таблице 4.

[0124] В отношении РНКи-агентов против PNPLA3, описанных в настоящем документе, нуклеотид в положении 1 антисмысловой нити (от 5'-конца к \rightarrow 3'-концу)

может быть абсолютно комплементарным гену PNPLA3 или может быть не комплементарным гену PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 антисмысловой нити (от 5'-конца \rightarrow к 3'-концу) представляет собой U, A или dT (или модифицированный вариант). В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 антисмысловой нити (от 5'-конца \rightarrow к 3'-концу) образует со смысловой нитью пару оснований A:U или U:A.

5

10

15

20

25

30

Смысловая нить, содержащая последовательность, приведенную в таблице 2 [0125] или таблице 4, может быть гибридизирована с любой антисмысловой нитью, содержащей последовательность, приведенную в таблице 2 или таблице 3, при условии, последовательности имеют область, на ПО меньшей комплементарную непрерывной нуклеотидной последовательности из 16, 17, 18, 19, 20 или 21 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 имеет смысловую нить, состоящую ИЗ любой из модифицированных последовательностей из таблицы 4, и антисмысловую нить, состоящую из любой из модифицированных последовательностей из таблицы 3. Примеры определенных репрезентативных спаренных последовательностей, обозначенных идентификационными номерами дуплексов, показаны в таблицах 5А и 5В.

[0126] некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 содержит, состоит из или по существу состоит из дуплекса, представленного любым из идентификационных номеров дуплексов, представленных в настоящем документе. В вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 некоторых нуклеотидные последовательности смысловой нити и антисмысловой нити любого из дуплексов с любым из идентификационных номеров, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 содержит нуклеотидные последовательности смысловой нити и антисмысловой нити любого из дуплексов с любыми идентификационными номерами, как представлено в настоящем документе, и нацеливающую группу и/или связующую группу, причем и/или нацеливающая группа связующая группа ковалентно конъюгирована) со смысловой нитью или антисмысловой нитью. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 содержит модифицированные нуклеотидные последовательности смысловой нити и антисмысловой нити любого из дуплексов с идентификационными номерами, как представлено в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 содержит модифицированные нуклеотидные последовательности смысловой нити и антисмысловой нити любого из дуплексов с идентификационными номерами, как представлено в настоящем документе, и нацеливающую группу и/или связующую группу, причем нацеливающая группа и/или связующая группа ковалентно связана со смысловой нитью или антисмысловой нитью.

5

10

15

20

25

30

[0127] В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 содержит антисмысловую нить и смысловую нить, имеющие нуклеотидные последовательности любого из дуплексов антисмысловая нить / смысловая нить из таблицы 2 или таблиц 5А и 5В, и дополнительно содержит нацеливающую группу или нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 содержит антисмысловую нить и смысловую нить, имеющие нуклеотидные последовательности любого из дуплексов антисмысловая нить / смысловая нить из таблицы 2 или таблиц 5А и 5В, и дополнительно содержит нацеливающую группу, представляющую собой лиганд рецептора асиалогликопротеинов.

[0128] Нацеливающую группу (с линкером или без него) можно связать с 5'- или 3'- концом любой из смысловой и/или антисмысловых нитей, описанных в таблицах 2, 3 и 4. Линкер (с нацеливающей группой или без нее) можно присоединить к 5'- или 3'- концу любой из смысловых и/или антисмысловых нитей, описанных в таблицах 2, 3 и 4.

[0129] В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 содержит антисмысловую нить и смысловую нить, имеющие нуклеотидные последовательности любого из дуплексов антисмысловая нить / смысловая нить из таблицы 2 или таблиц 5А и 5В, и дополнительно содержит нацеливающий лиганд, выбранный из группы, состоящей из: (NAG37) и (NAG37)s, все показаны в таблице 6.

[0130] В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 содержит антисмысловую нить и смысловую нить, имеющие модифицированные нуклеотидные последовательности любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой нити и/или смысловой нити из таблицы 3 или таблицы 4.

[0131] В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 содержит антисмысловую нить и смысловую нить, имеющие модифицированные нуклеотидные последовательности любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой нити и/или смысловой нити любого из дуплексов из таблиц 5A и 5B, и дополнительно содержит нацеливающую группу, представляющую собой лиганд рецептора асиалогликопротеинов.

[0132] В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против РNPLA3 содержит, состоит из или по существу состоит из любого из дуплексов из таблиц 5A или 5B.

Таблица 5А. Дуплексы РНКи-агентов против PNPLA3 с соответствующими идентификационными номерами смысловой и антисмысловой нити

II	Идентифи-	Идентифи-
Идентифи-	катор	катор
катор дуплекса	антисмысло	- смысловой
,	вой нити	нити
	J1M00002-AS	J1M00001-SS
	J1M00004-AS	J1M00003-SS
	J1M00006-AS	J1M00005-SS
	J1M00008-AS	J1M00007-SS
	J1M00010-AS	J1M00009-SS
	J1M00012-AS	J1M00011-SS
	J1M00014-AS	J1M00013-SS
	J1M00016-AS	J1M00015-SS
	J1M00020-AS	J1M00019-SS
	J1M00020-AS	J1M00021-SS
	J1M00023-AS	J1M00022-SS
	J1M00025-AS	J1M00024-SS
	J1M00027-AS	J1M00026-SS
	J1M00029-AS	J1M00028-SS
	J1M00031-AS	J1M00030-SS
	J1M00032-AS	J1M00019-SS
	J1M00034-AS	J1M00033-SS
	J1M00036-AS	J1M00035-SS
	J1M00038-AS	J1M00037-SS
	J1M00040-AS	J1M00039-SS
	J1M00042-AS	J1M00041-SS
	J1M00046-AS J1M00050-AS	J1M00045-SS J1M00049-SS
	J1M00050-AS J1M00052-AS	J1M00049-SS J1M00051-SS
	J1M00052-AS J1M00052-AS	J1M00031-SS
	J1M00032-AS J1M00023-AS	J1M00022-SS
	J1M00023-AS J1M00057-AS	J1M00056-SS
	J1M00057-AS J1M00059-AS	J1M00058-SS
	J1M00053-AS	J1M00058-SS
	J1M00003-AS	J1M00002-3S
	J1M00072-AS J1M00074-AS	J1M00071-3S
	J1M00074-AS	J1M00075-SS
	J1M00077-AS	J1M00078-SS
	J1M00077-AS	J1M00080-SS
	J1M00082-AS	J1M00081-SS
	J1M00082-AS	J1M00083-SS
	J1M00016-AS	J1M00084-SS
	J1M00113-AS	J1M00015-SS
	J1M00114-AS	J1M00015-SS
	J1M00115-AS	J1M00015-SS
	J1M00116-AS	J1M00015-SS
	J1M00016-AS	J1M00117-SS
	J1M00016-AS	J1M00118-SS
	J1M00016-AS	J1M00119-SS
J1D00081 .	J1M00121-AS	J1M00120-SS
J1D00082 .	J1M00123-AS	J1M00122-SS
J1D00083	J1M00125-AS	J1M00124-SS
	J1M00127-AS	J1M00126-SS
J1D00085	J1M00129-AS	J1M00128-SS

Илогитифи	Идентифи-	Идентифи-
Идентифи-	катор	катор
катор	антисмысло-	смысловой
дуплекса	вой нити	нити
J1D00087	J1M00133-AS	J1M00132-SS

Таблица 5В. Дуплексы РНКи-агентов против PNPLA3 с соответствующими идентификационными номерами смысловой (SS) и антисмысловой нити (SS) и идентификационными номерами последовательностей для модифицированных и немодифицированных последовательностей нуклеотидов.

Дуплекс	ид AS	AS, модиф. SEQ ID NO:	AS, без модиф. SEQ ID NO:	ид ss		SS, без модиф. SEQ ID NO:
J1D00001	J1M00002-AS	88	174	J1M00001-SS	129	212
J1D00002	J1M00004-AS	89	175	J1M00003-SS	130	213
J1D00003	J1M00006-AS	90	176	J1M00005-SS	131	214
J1D00004	J1M00008-AS	91	177	J1M00007-SS	132	215
J1D00005	J1M00010-AS	92	178	J1M00009-SS	133	216
J1D00006	J1M00012-AS	93	179	J1M00011-SS	134	217
J1D00007	J1M00014-AS	94	180	J1M00013-SS	135	218
J1D00008	J1M00016-AS	95	181	J1M00015-SS	136	
J1D00010	J1M00020-AS	96	182	J1M00019-SS	137	220
J1D00011	J1M00020-AS	96	183	J1M00021-SS	138	
J1D00012	J1M00023-AS	97	184	J1M00022-SS	139	
J1D00013	J1M00025-AS	98	185	J1M00024-SS	140	
J1D00014	J1M00027-AS	99	186	J1M00026-SS	141	
J1D00015	J1M00029-AS	100		J1M00028-SS	142	
J1D00016	J1M00031-AS	101	188	J1M00030-SS	143	226
J1D00017	J1M00032-AS	102	189	J1M00019-SS	137	220
J1D00018	J1M00034-AS	103	190	J1M00033-SS	144	227
J1D00019	J1M00036-AS	104	191	J1M00035-SS	145	228
J1D00020	J1M00038-AS	105	192	J1M00037-SS	146	229
J1D00021	J1M00040-AS	106	193	J1M00039-SS	147	230
J1D00022	J1M00042-AS	107	194	J1M00041-SS	148	231
J1D00024	J1M00046-AS	108		J1M00045-SS	149	
J1D00026	J1M00050-AS	109	196	J1M00049-SS	150	233
J1D00027	J1M00052-AS	110	197	J1M00051-SS	151	234
J1D00028	J1M00052-AS	110	198	J1M00022-SS	152	222
J1D00029	J1M00023-AS	97	183	J1M00053-SS	153	235
J1D00032	J1M00057-AS	111	199	J1M00056-SS	154	237
J1D00033	J1M00059-AS	112	200	J1M00058-SS	155	238
J1D00035	J1M00063-AS	113	201	J1M00062-SS	156	239
J1D00040	J1M00072-AS	114	202	J1M00071-SS	157	240
J1D00041	J1M00074-AS	115	203		158	241
J1D00043	J1M00077-AS	116	204	J1M00076-SS	159	242
J1D00044	J1M00079-AS	117	205		160	243
J1D00045	J1M00077-AS	116	206	J1M00080-SS	161	244

Дуплекс	ид AS	MACHINA	AS, без модиф. SEQ ID NO:	ид ss	SS, модиф. SEQ ID NO:	SS, без модиф. SEQ ID NO:
J1D00046	J1M00082-AS	118	207	J1M00081-SS	162	245
J1D00047	J1M00082-AS	118	207	J1M00083-SS	163	246
J1D00048	J1M00016-AS	95	181	J1M00084-SS	164	247
J1D00074	J1M00113-AS	119	210	J1M00015-SS	136	219
J1D00075	J1M00114-AS	120	211	J1M00015-SS	136	219
J1D00076	J1M00115-AS	121	212	J1M00015-SS	136	219
J1D00077	J1M00116-AS	122	213	J1M00015-SS	136	219
J1D00078	J1M00016-AS	95	181	J1M00117-SS	165	248
J1D00079	J1M00016-AS	95	181	J1M00118-SS	166	249
J1D00080	J1M00016-AS	95	181	J1M00119-SS	167	250
J1D00081	J1M00121-AS	123	206	J1M00120-SS	168	251
J1D00082	J1M00123-AS	124	207	J1M00122-SS	169	252
J1D00083	J1M00125-AS	125	208	J1M00124-SS	170	253
J1D00084	J1M00127-AS	126	209	J1M00126-SS	171	254
J1D00085	J1M00129-AS	127	210	J1M00128-SS	172	255
J1D00087	J1M00133-AS	128	211	J1M00132-SS	173	256

[0133] В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 получают или предлагают в виде соли, смешанной соли или свободной кислоты. РНКи-агенты, описанные в настоящем документе, при доставке в клетку, экспрессирующую ген PNPLA3, ингибируют или уменьшают экспрессию одного или более генов PNPLA3 *in vivo* и/или *in vitro*.

Нацеливающие лиганды или группы, связующие группы и доставляющие несущие среды

5

10

15

[0134] В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против РNPLA3 конъюгирован с одной или более ненуклеотидными группами, включая, без ограничений, нацеливающую группу, связующую группу, нацеливающий лиганд, доставляющий полимер или доставляющую несущую среду. Ненуклеотидная группа может усиливать нацеливание, доставку или присоединение РНКи-агента. Примеры нацеливающих групп и связующих групп представлены в таблице 6. Ненуклеотидная группа может быть ковалентно связана с 3'- и/или 5'-концом любой из смысловой нити и/или антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 содержит ненуклеотидную группу, связанную с 3'- и/или 5'-концом смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления группа связана с 5'-

концом смысловой нити РНКи-агента против PNPLA3. Ненуклеотидная группа может быть напрямую или опосредованно связана с РНКи-агентом посредством линкера/связующей группы. В некоторых вариантах осуществления ненуклеотидная группа связана с РНКи-агентом посредством неустойчивой, расщепляемой или обратимой связи или линкера.

5

10

15

20

25

30

[0135] В некоторых вариантах осуществления ненуклеотидная группа усиливает фармакокинетические или биораспределительные свойства РНКи-агента или конъюгата, к которому она присоединена, для повышения клеточно- или тканеспецифического распределения и клеточноспецифического захвата РНКи-агента или конъюгата. В некоторых вариантах осуществления ненуклеотидная группа усиливает эндоцитоз РНКи-агента.

[0136] Нацеливающие группы или нацеливающие фрагменты усиливают фармакокинетические или биораспределительные свойства конъюгата или РНКиагента, к которым они присоединены, для улучшения клеточноспецифического (включая, некоторых случаях, органоспецифического) распределения клеточноспецифического (или органоспецифического) захвата конъюгата или РНКи-Нацеливающая группа быть одновалентной, двухвалентной, агента. может трехвалентной, четырехвалентной или иметь более высокую валентность в отношении мишени. Репрезентативные нацеливающие группы включают в себя, без ограничений, соединения с аффинностью к молекуле клеточной поверхности, лиганды клеточных рецепторов, гаптены, антитела, моноклональные антитела, фрагменты антител и миметики антител с аффинностью к молекулам клеточной поверхности.

[0137] В некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа связана с РНКи-агентом с помощью линкера, такого как ПЭГ-линкер или одна, две или три лишенные азотистого основания и/или рибитные (лишенные азотистого основания рибоза) группы, которые в некоторых случаях выступают в качестве линкеров. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд содержит производный от галактозы кластер.

[0138] РНКи-агенты против PNPLA3, описанные в настоящем документе, могут быть синтезированы \mathbf{c} использованием реакционноспособной группы, такой аминогруппа (также именуемая настоящем документе «амином»), на 5'-конце и/или 3'конце. Реакционноспособную группу онжом применять для последующего присоединения нацеливающего фрагмента с использованием способов, типичных для данной области.

[0139] В некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа содержит лиганд рецептора асиалогликопротеинов. В настоящем документе лиганд рецептора асиалогликопротеинов представляет собой лиганд, который содержит фрагмент, имеющий аффинность к рецептору асиалогликопротеинов. Как отмечено в настоящем документе, рецептор асиалогликопротеинов имеет высокую экспрессию в гепатоцитах. В некоторых вариантах осуществления лиганд рецептора асиалогликопротеинов включает в себя или состоит из одного или более производных галактозы. При использовании в настоящем документе термин «производное галактозы» включает галактозу производные галактозы, имеющие аффинность асиалогликопротеинов, равную или превышающую аффинность галактозы. Примеры производного галактозы включают, без ограничений, галактозу, галактозамин, N-N-ацетилгалактозамин, N-пропионил-галактозамин, формилгалактозамин, бутаноилгалактозамин и N-изобутаноилгалактозамин (см., например, S.T. Iobst and K. Drickamer, J.B.C., 1996, 271, 6686). В данной области известны производные галактозы и кластеры производных галактозы, которые можно использовать для нацеливания іп vivo олигонуклеотидов и других молекул в отношении печени (см., например, Baenziger and Fiete, 1980, Cell, 22, 611-620; Connolly et al., 1982, J. Biol. Chem., 257, 939–945).

5

10

15

20

25

30

[0140] Производные галактозы применяли для нацеливания молекул на гепатоциты іп vivo посредством их связывания с рецептором асиалогликопротеинов (ASGPr), экспрессированным на поверхности гепатоцитов. Связывание лигандов рецепторов асиалогликопротеинов с рецептором (-ами) асиалогликопротеинов способствует клеточноспецифичному нацеливанию на гепатоциты и эндоцитозу молекулы в гепатоциты. Лиганды рецепторов асиалогликопротеинов могут быть мономерными (например, иметь одно производное галактозы; они также именуются одновалентными или однозубцовыми) или мультимерными (например, иметь множество производных галактозы). Производное галактозы или кластер производных галактозы может быть присоединен к 3'-концу или 5'-концу смысловой или антисмысловой нити РНКи-агента с помощью способов, известных в данной области. Приготовление нацеливающих лигандов, таких как кластеры производных галактозы, описано, например, в опубликованной заявке на международный патент № WO 2018/044350, Arrowhead Pharmaceuticals, Inc., и в опубликованной заявке на международный патент № WO 2017/156012, Arrowhead Pharmaceuticals, Inc., содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

[0141] В настоящем документе кластер производных галактозы содержит молекулу, имеющую от двух до четырех концевых производных галактозы. Терминальное производное галактозы присоединено к молекуле посредством атома углерода С-1. В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы представляет собой тример производного галактозы (также называемый трехантенным производным галактозы или трехвалентным производным галактозы). В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы содержит N-ацетилгалактозамины. В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы содержит три N-ацетилгалактозамина. В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы (также называемый четырехантенным производным галактозы или четырехвалентным производным галактозы). В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы содержит четыре N-ацетилгалактозамина.

5

10

15

20

25

30

[0142] В настоящем документе тример производного галактозы содержит три производных галактозы, каждое из которых связано с центральной точкой ветвления. В настоящем документе тетрамер производного галактозы содержит четыре производных галактозы, каждое из которых связано с центральной точкой ветвления. Производные галактозы могут быть присоединены к центральной точке ветвления посредством атомов углерода С-1 сахаридов. В некоторых вариантах осуществления производные галактозы связаны с точкой ветвления посредством линкеров или спейсеров. В некоторых вариантах осуществления линкер или спейсер представляет собой гибкий гидрофильный спейсер, такой как ПЭГ-группа (см., например, патент США № 5,885,968; Biessen et al. J. Med. Chem. 1995 Vol. 39 p. 1538-1546). В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-спейсер представляет собой ПЭГ₃-спейсер. Точка ветвления может представлять собой любую малую молекулу, которая позволяет присоединить три производных галактозы и дополнительно позволяет присоединить точку ветвления к РНКи-агенту. Примером группы точек ветвления является дилизин или диглутамат. Присоединение точки ветвления к РНКи-агенту можно осуществлять посредством линкера или спейсера. В некоторых вариантах осуществления линкер или спейсер содержит гибкий гидрофильный спейсер, такой как, без ограничений, ПЭГспейсер. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит жесткий линкер, такой как циклическая группа. В некоторых вариантах осуществления производное галактозы содержит или состоит из N-ацетилгалактозамина. В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы состоит из тетрамера производного галактозы, который может представлять собой, например, тетрамер N-ацетилгалактозамина.

[0143] Варианты осуществления настоящего описания включают фармацевтические композиции для доставки РНКи-агента против PNPLA3 в клетку печени *in vivo*. Такие фармацевтические композиции могут включать в себя, например, РНКи-агент против PNPLA3, конъюгированный с кластером производных галактозы. В некоторых вариантах осуществления кластер производных галактозы состоит из тримера производного галактозы, который может представлять собой, например, тример N-ацетилгалактозамина, или тетрамера производного галактозы, который может представлять собой, например, тетрамер N-ацетилгалактозамина.

5

10

15

20

25

30

[0144] Нацеливающий лиганд или нацеливающую группу можно связать с 3'- или 5'- концом смысловой нити или антисмысловой нити РНКи-агента против PNPLA3, описанного в настоящем документе.

[0145] К нацеливающим лигандам относятся, без ограничений, (NAG37) и (NAG37)s, определенные в таблице 6. Другие нацеливающие группы и нацеливающие лиганды, включая нацеливающие лиганды с галактозным кластером, известны в данной области.

[0146] В некоторых вариантах осуществления связующая группа конъюгирована с РНКи-агентом. Связующая группа способствует ковалентному связыванию агента с нацеливающей группой, доставляющим полимером или доставляющей несущей средой. Связующая группа может быть связана с 3'- или 5'-концом смысловой нити или антисмысловой нити РНКи-агента. В некоторых вариантах осуществления связующая группа связана со смысловой нитью РНКи-агента. В некоторых вариантах осуществления связующая группа конъюгирована с 5'- или 3'-концом смысловой нити РНКи-агента. В некоторых вариантах осуществления связующая конъюгирована с 5'-концом смысловой нити РНКи-агента. Примеры связующих групп могут включать, без ограничений, реакционноспособные группы, такие как первичные амины и алкины, алкильные группы, лишенные азотистого основания нуклеотиды, рибит (лишенная азотистого основания рибоза) и/или ПЭГ-группы.

[0147] В некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа внутренне связана с нуклеотидом на смысловой нити и/или антисмысловой нити РНКи-агента. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая группа связана с РНКи-агентом посредством линкера.

[0148] Линкер или связующая группа представляет собой соединение между двумя атомами, которое связывает одну интересующую химическую группу (такую как

5

10

15

20

25

30

РНКи-агент) или сегмент с другой интересующей химической группой (такой как нацеливающая группа или доставляющий полимер) или сегментом посредством одной или более ковалентных связей. Неустойчивое соединение содержит неустойчивую связь. Соединение может необязательно включать в себя спейсер, который увеличивает расстояние между двумя соединенными атомами. Спейсер может дополнительно повышать гибкость и/или длину соединения. Спейсеры включают в себя, без ограничений, алкильные группы, алкенильные группы, алкинильные группы, арильные группы, аралкильные группы, аралкенильные группы и аралкинильные группы, каждая из которых может содержать один или более гетероатомов, гетероциклов, аминокислот, нуклеотидов и сахаридов. Спейсерные группы хорошо известны в данной области, и приведенный выше список не предназначен для ограничения объема данного описания. [0149] В некоторых вариантах осуществления, в которых в одну композицию включены два или более РНКи-агентов, каждый из РНКи-агентов может быть связан с одной и той же нацеливающей группой или с двумя различными нацеливающими группами (например, нацеливающими группами, имеющими различную химическую структуру). В некоторых вариантах осуществления нацеливающие группы связаны с описанными в настоящем документе РНКи-агентами против PNPLA3 без применения дополнительного линкера. В некоторых вариантах осуществления сама нацеливающая группа выполнена с уже присутствующим линкером или другим сайтом для облегчения конъюгации. В некоторых вариантах осуществления, когда два или более РНКиагентов против PNPLA3 включены в одну молекулу, каждый из РНКи-агентов может использовать один и тот же линкер или разные линкеры (т. е. линкеры, имеющие различные химические структуры).

[0150] Любая из нуклеотидных последовательностей РНКи-агента против PNPLA3, перечисленных в таблицах 2, 3 или 4, как модифицированных, немодифицированных, может содержать нацеливающую (-ие) группу (-ы) и/или связующую (-ие) группу (-ы) на 3'- и/или 5'-конце. Любая из последовательностей РНКи-агента против PNPLA3, перечисленных в таблицах 3 или 4 или иным образом описанных в настоящем документе, которая содержит нацеливающую группу и/или связующую группу на 3'- или 5'-конце, может альтернативно не содержать нацеливающую группу или связующую группу на 3'- или 5'-конце или может содержать другую нацеливающую группу или связующую группу на 3'- или 5'-конце, включая, без ограничений, группы, показанные в таблице 6. Любой из дуплексов РНКи-агента против PNPLA3, перечисленных В таблицах 5A или 5B.

модифицированный или немодифицированный, может дополнительно содержать нацеливающую группу или связующую группу, включая, без ограничений, группы, показанные в таблице 6, и нацеливающая группа или связующая группа может быть присоединена к 3'- или 5'-концу смысловой нити или антисмысловой нити дуплекса РНКи-агента против PNPLA3.

5

10

[0151] Примеры нацеливающих групп и связующих групп (которые при комбинировании могут образовывать нацеливающие лиганды) представлены в таблице 6. В таблице 4 представлено несколько вариантов осуществления смысловых нитей РНКи-агента против PNPLA3, имеющих нацеливающую группу или связующую группу, связанную с 5′- или 3′-концом.

Таблица 6. Структуры, представляющие различные модифицированные нуклеотиды, нацеливающие лиганды или нацеливающие группы, кэпирующие остатки и связующие группы

При внутреннем расположении:

связь в сторону 5'-конца

связь в сторону 3'-конца

(invAb)

При внутреннем расположении:

связь в сторону 5'-конца

связь в сторону 3'-конца

(invAb)s

[0152] В каждой из приведенных выше структур из таблицы 6 NAG содержит N-ацетилгалактозамин или другое производное галактозы, как будет понятно среднему

специалисту в данной области, подлежащий присоединению с учетом вышеперечисленных структур и описания, приведенного в настоящем документе.

[0153] Каждый (NAGx) может быть присоединен к РНКи-агенту против PNPLA3 посредством фосфатной группы (как в (NAG37)) или фосфоротиоатной группы (как в (NAG37)s), или другой связующей группы.

5

10

15

20

25

30

Фосфатная группа Фосфоротиоатная группа

Можно использовать и другие связующие группы, известные в данной области.

В некоторых вариантах осуществления для доставки РНКи-агента в клетку [0154] или ткань можно использовать доставляющую несущую среду. Доставляющая несущая среда представляет собой соединение, которое улучшает доставку РНКи-агента в клетку или ткань. Доставляющая несущая среда может включать в себя или состоять из, без ограничений, полимера, такого как амфипатический полимер, мембранноактивного полимера, пептида, пептида мелитина, мелитиноподобного пептида (MLP), обратимо модифицированного полимера или пептида или обратимо модифицированного мембранно-активного полиамина. В некоторых осуществления РНКи-агенты можно комбинировать с липидами, наночастицами, полимерами, липосомами, мицеллами, дифосфатидилхолинами (DPC) или другими системами доставки, доступными в данной области. РНКи-агенты также могут быть химически конъюгированы с нацеливающими группами, липидами (включая, без ограничений, холестерин и производные холестерина), наночастицами, полимерами, липосомами, мицеллами, DPC (см., например, публикации WO 2000/053722, WO 2008/0022309, WO 2011/104169 и WO 2012/083185, WO 2013/032829, WO 2013/158141, каждая из которых включена в настоящий документ путем ссылки), гидрогелями, циклодекстринами, биоразлагаемыми нанокапсулами И биоадгезивными микросферами, белковыми векторами или другими системами доставки, известными или доступными в данной области, приемлемыми для нуклеиновой кислоты или олигонуклеотида.

Фармацевтические композиции и составы

5

10

15

20

25

30

[0155] РНКи-агенты против PNPLA3, описанные в настоящем документе, могут быть получены в виде фармацевтических композиций или составов (также именуемых в настоящем документе «лекарственными средствами»). В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции включают в себя по меньшей мере один РНКи-агент против PNPLA3. Эти фармацевтические композиции, в частности, используют для ингибирования экспрессии целевой мРНК в клетке-мишени, группе клеток, ткани или организме.

[0156] Фармацевтические композиции можно применять для лечения субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние, при котором снижение концентрации целевой мРНК PNPLA3 или ингибирование экспрессии целевого гена обеспечит благоприятный эффект. Фармацевтические композиции можно применять для лечения субъекта, у которого имеется риск развития заболевания, расстройства или состояния, при котором снижение концентрации целевой мРНК или ингибирование экспрессии целевого гена обеспечит благоприятный эффект. В одном варианте осуществления способ включает введение РНКи-агента против PNPLA3, связанного с нацеливающим лигандом, описанным в настоящем документе, подлежащему лечению субъекту. В некоторых вариантах осуществления один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов (включая несущие среды, носители, разбавители и/или доставляющие полимеры) добавляют в фармацевтические композиции, которые включают в себя РНКи-агент против PNPLA3, таким образом можно получить фармацевтический состав или лекарство, приемлемое для доставки субъекту, в том числе человеку, *in vivo*.

[0157] Фармацевтические композиции, которые включают в себя РНКи-агент против PNPLA3, и способы, описанные в настоящем документе, снижают концентрацию целевой мРНК в клетке, группе клеток, ткани, органе или субъекте посредством введения субъекту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе РНКи-агента против PNPLA3 с ингибированием таким образом экспрессии целевой мРНК PNPLA3 у субъекта. В некоторых вариантах осуществления у субъекта ранее выявлено или диагностировано наличие патогенного повышения экспрессии целевого гена в целевой клетке или ткани. В некоторых вариантах осуществления у субъекта ранее выявлен или диагностирован NAFLD, NASH, фиброз печени и/или алкогольное или неалкогольное заболевание печени, такое как цирроз печени. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает от симптомов, связанных с

NAFLD, NASH, фиброзом печени и/или алкогольным или неалкогольным заболеванием печени, таким как цирроз печени.

[0158] В некоторых вариантах осуществления описанные фармацевтические композиции, включающие РНКи-агент против PNPLA3, применяют для лечения или контроля клинических проявлений, связанных с NAFLD, NASH, фиброзом печени, алкогольными или неалкогольными заболеваниями печени, включая цирроз печени, и/или со сверхэкспрессией PNPLA3 у субъекта. В некоторых вариантах осуществления терапевтически (в том числе, профилактически) эффективное количество одной или более из фармацевтических композиций вводят нуждающемуся в таком лечении субъекту. В некоторых вариантах осуществления введение любого из описанных РНКи-агентов против PNPLA3 можно использовать для уменьшения числа, тяжести и/или частоты симптомов заболевания у субъекта.

[0159] Описанные фармацевтические композиции, включающие РНКи-агент против PNPLA3, можно применять для лечения по меньшей мере одного симптома у субъекта, имеющего заболевание или расстройство, при котором снижение или ингибирование экспрессии мРНК PNPLA3 обеспечит благоприятный эффект. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят терапевтически эффективное количество одной или более фармацевтических композиций, включающих в себя РНКи-агент против PNPLA3, с осуществлением таким образом лечения симптома. В других вариантах осуществления субъекту вводят профилактически эффективное количество одного или более РНКи-агентов против PNPLA3 с предотвращением или ингибированием таким образом по меньшей мере одного симптома.

[0160] Способ введения представляет собой путь, посредством которого РНКи-агент против PNPLA3 вводят в контакт с телом. В целом способы введения лекарственных средств и олигонуклеотидов и нуклеиновых кислот для лечения млекопитающих хорошо известны в данной области и могут быть применены для введения композиций, описанных в настоящем документе. РНКи-агенты против PNPLA3, описанные в настоящем документе, можно вводить посредством любого приемлемого способа в препарате, специально предназначенном для конкретного способа. Таким образом, описанные в настоящем документе фармацевтические композиции можно вводить путем инъекции, например внутривенно, внутримышечно, внутрикожно, подкожно, внутрисуставно или внутрибрюшинно. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе фармацевтические композиции вводят посредством полкожной инъекции.

Фармацевтические композиции, включающие в себя РНКи-агент против [0161] PNPLA3, описанный в настоящем документе, могут быть доставлены в клетку, группу клеток, ткань или субъект с использованием способов доставки олигонуклеотидов, известных в данной области. В целом любой приемлемый способ, используемый в данной области для доставки молекулы нуклеиновой кислоты (in vitro или in vivo), можно адаптировать для применения с композициями, описанными в настоящем документе. Например, доставка может осуществляться путем локального введения (например, прямой инъекции, имплантации или местного введения), системного введения или подкожного, внутривенного, внутрибрющинного, или парентеральными способами, включая внутричерепное (например, внутрижелудочковое, интрапаренхиматозное и интратекальное), внутримышечное, трансдермальное, ингаляционное (аэрозольное), назальное, пероральное, ректальное или местное (включая буккальное и сублингвальное) введение. В определенных вариантах осуществления композиции вводят путем подкожной или внутривенной инфузии или инъекции.

5

10

15

20

25

30

[0162] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, содержат один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов. Описанные в настоящем документе фармацевтические композиции приготовлены для введения субъекту.

В настоящем документе фармацевтическая композиция или лекарственное [0163] средство включает в себя фармакологически эффективное количество по меньшей мере одного из описанных терапевтических соединений и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов. Фармацевтически приемлемые эксципиенты представляют собой вещества, отличные от активного фармацевтического ингредиента (АФИ, терапевтическое средство, например РНКи-агент против PNPLA3), которые намеренно включены в систему доставки лекарственного средства. Эксципиенты не оказывают или не предназначены для оказания терапевтического воздействия в предусмотренной Эксципиенты могут a) способствовать обработке системы лекарственного средства в процессе получения, b) защищать, поддерживать или повышать стабильность, биодоступность или переносимость АФИ пациентом, с) содействовать определению подлинности продукта и/или d) усиливать любую другую характеристику общей безопасности, эффективности, доставки АФИ во время хранения или применения. Фармацевтически приемлемый эксципиент может быть или не быть инертным веществом.

[0164] Эксципиенты включают, без ограничений, усилители антиадгезивы, противовспенивающие агенты, антиоксиданты, связующие вещества, буферные агенты, носители, покрывающие агенты, красители, улучшающие доставку средства, доставляющие полимеры, детергенты, декстран, декстрозу, разбавители, эмульгаторы, сухие разбавители, разрых лители, наполнители, ароматизаторы, способствующие скольжению вещества, увлажнители, смазывающие вещества, масла, полимеры, консерванты, физраствор, соли, растворители, сахара, поверхностноактивные вещества, суспендирующие агенты, матрицы замедленным высвобождением, подсластители, загустители, регуляторы тоничности, несущие среды, водоотталкивающие агенты и смачивающие агенты.

5

10

15

20

25

30

[0165] Фармацевтические композиции, пригодные для инъекционного введения, включают стерильные водные растворы (если они водорастворимые), либо дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных растворов для инъекций, либо дисперсии для инъекций непосредственно перед введением. Для внутривенного введения приемлемые носители включают физраствор, бактериостатическую воду, Cremophor® ELTM (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Приемлемые носители должны быть стабильны в условиях получения и хранения и должны быть защищены от загрязняющего воздействия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их приемлемые смеси. Надлежащую текучесть можно обеспечить, например, посредством применения веществ для создания оболочки, таких как лецитин, посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии, а также посредством применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как манит, сорбит и хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить посредством включения в композицию агента, который замедляет всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

[0166] Стерильные растворы для инъекций можно получать посредством введения активного соединения в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, в зависимости от необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. По существу дисперсии получают посредством введения активного соединения в стерильную несущую среду,

которая содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций способы приготовления включают вакуумную сушку и сублимационную сушку, в результате которых из предварительно стерилизованного фильтрацией раствора образуется порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный нужный ингредиент.

5

10

15

20

25

30

[0167] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы, которые включают РНКи-агенты против PNPLA3, описанные в настоящем документе, приемлемые для подкожного введения, могут быть приготовлены в водном фосфатонатриевом буфере (например, РНКи-агент против PNPLA3, приготовленный в 0,5 мМ растворе одноосновного фосфата натрия, 0,5 мМ растворе двуосновного фосфата натрия, в воде)

[0168]Составы, приемлемые для внутрисуставного введения, могут находиться в форме стерильного водного препарата лекарственного средства, который может быть представлен В микрокристаллической форме, например форме водной микрокристаллической суспензии. Липосомные биоразлагаемые составы или полимерные системы также можно использовать для включения лекарственного средства для внутрисуставного и внутриглазного введения.

[0169] Кроме того, могут быть получены составы, приемлемые для перорального введения РНКи-агентов против PNPLA3, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агенты против PNPLA3, описанные в настоящем документе, вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агенты против PNPLA3, описанные в настоящем документе, приготовлены в капсуле для перорального введения.

[0170] Активные соединения могут быть составлены с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого выведения из тела, например составы с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биологически разлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота. Специалистам в данной области будут очевидны способы приготовления таких составов. В качестве фармацевтически приемлемых носителей можно также использовать липосомные суспензии. Их можно получать в соответствии со способами, известными специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № 4,522,811.

[0171] РНКи-агенты против PNPLA3 можно получать в композициях в единичной дозированной форме для простоты введения и единообразия дозы. Единичная дозированная форма относится к физически дискретным единицам, пригодным для применения в качестве единичных доз для субъекта, подлежащего лечению; причем каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное на получение желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для единичных дозированных форм настоящего описания продиктована и непосредственно зависит от уникальных характеристик активного соединения и необходимого терапевтического эффекта и ограничений, присущих области составления композиций с таким активным соединением для лечения субъектов.

[0172] Фармацевтическая композиция может содержать другие дополнительные компоненты, обычно встречающиеся в фармацевтических композициях. Такие дополнительные компоненты включают, без ограничений, противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики, анальгетики, антигистаминные препараты или противовоспалительные агенты (например, ацетаминофен, НПВП, дифенгидрамин и т. д.). Кроме того, предполагается, что клетки, ткани или изолированные органы, которые экспрессируют или содержат описанные в настоящем документе РНКи-агенты, можно использовать в качестве «фармацевтических композиций». При использовании в настоящем документе термин «фармакологически эффективное количество», «терапевтически эффективное количество» или просто «эффективное количество» относится к такому количеству РНКи-агента, с помощью которого можно достичь фармакологического, терапевтического или профилактического результата.

[0173] В некоторых вариантах осуществления в дополнение к введению РНКи-агента, описанного в настоящем документе, способы, описанные в настоящем документе, дополнительно включают стадию введения второго терапевтического агента или лечения В некоторых вариантах реализации второе терапевтическое средство представляет собой другой РНКи-агент против PNPLA3 (например, PHКи-агент против PNPLA3, нацеленный на другую последовательность в мишени PNPLA3). В других вариантах осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой низкомолекулярное лекарственное средство, антитело, фрагмент антитела или аптамер.

[0174] В некоторых вариантах осуществления описанный (-ые) РНКи-агент (-ы) против PNPLA3 необязательно комбинируют с одним или более дополнительными

5

10

15

20

25

30

терапевтическими средствами. РНКи-агент против PNPLA3 и дополнительное (-ые) терапевтическое (-ие) средство (-а) можно вводить в одной композиции, или их можно вводить по отдельности. В некоторых вариантах осуществления одно или более дополнительных терапевтических средств вводят отдельно от РНКи-агента, в отдельных дозированных формах (например, РНКи-агент против PNPLA3 вводят путем подкожной инъекции, а дополнительное терапевтическое средство, применяемое в режиме дозирования в рамках способа лечения, вводят перорально). В некоторых вариантах осуществления описанный (-ые) РНКи-агент (-ы) против PNPLA3 вводят нуждающемуся в этом субъекту посредством подкожной инъекции, а один или более дополнительных терапевтических агентов вводят перорально, что вместе представляет собой схему лечения заболеваний и состояний, связанных с NAFLD, NASH, фиброзом печени и/или алкогольными или неалкогольными заболеваниями печени, включая цирроз печени. В некоторых вариантах осуществления описанный (-ые) РНКи-агент (ы) против PNPLA3 вводят нуждающемуся в этом субъекту посредством подкожной инъекции, а один или более дополнительных терапевтических агентов вводят посредством отдельной подкожной инъекции. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент против PNPLA3 и один или более дополнительных терапевтических средств комбинируют в одну лекарственную форму (например, «коктейль», приготовленный в виде одной композиции для подкожной инъекции). РНКи-агенты против PNPLA3, содержащие или не содержащие одно или более дополнительных терапевтических средств, можно комбинировать с одним или более эксципиентами с образованием фармацевтических композиций.

[0175] По существу эффективное количество РНКи-агента против PNPLA3 будет находиться в диапазоне от около 0,1 до около 100 мг/кг массы тела/дозу, например от около 1,0 до около 50 мг/кг массы тела /дозу. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество активного соединения будет находиться в диапазоне от около 0,25 до около 5 мг/кг массы тела на одну дозу. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество активного ингредиента будет находиться в диапазоне от около 0,5 до около 4 мг/кг массы тела на одну дозу. Введение дозы может осуществляться еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или в любом другом интервале в зависимости от дозы вводимого РНКи-агента против PNPLA3, уровня активности конкретного РНКи-агента против PNPLA3 и требуемого уровня ингибирования для конкретного субъекта. Примеры в настоящем документе показывают приемлемые уровни ингибирования для определенных видов животных. Введенное количество

будет зависеть от таких факторов, как общее состояние здоровья пациента, относительная биологическая эффективность доставляемого соединения, состав лекарственного средства, наличие и типы эксципиентов в составе и способ введения. Следует также понимать, что вводимую начальную дозу можно увеличить сверх вышеуказанного верхнего уровня, чтобы быстро достичь требуемой концентрации в крови или концентрации в ткани, или начальная доза может быть меньше оптимальной. [0176] Для лечения заболевания или для формирования лекарственного средства или композиции для лечения заболевания фармацевтические композиции, описанные в

настоящем документе, включающие РНКи-агент против PNPLA3, комбинировать с эксципиентом или со вторым терапевтическим агентом или типом включая, без ограничений, второй или другой РНКи-агент, лечения, низкомолекулярное лекарственное средство, антитело, фрагмент антитела, пептид и/или аптамер.

[0177] Описанные РНКи-агенты против PNPLA3 при добавлении к фармацевтически приемлемым эксципиентам или адъювантам могут быть упакованы в наборы, контейнеры, упаковки или диспенсеры. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть упакованы в предварительно заполненные шприцы, шприц-ручки, автоинжекторы, инфузионные мешки/устройства или флаконы.

Способы лечения и ингибирование экспрессии

5

10

15

20

25

30

[0178] РНКи-агенты против PNPLA3, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения субъекта (например, человека или млекопитающего), имеющего заболевание или расстройство, при котором введение РНКи-агентов может обеспечить благоприятный эффект. В некоторых вариантах осуществления изобретения РНКи-агенты, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения субъекта (например, человека), который может получить благоприятный эффект от снижения и/или ингибирования экспрессии белка мРНК PNPLA3 и/или уровня белка PNPLA3, например, у субъекта, у которого диагностирован или который страдает от симптомов, связанных с NAFLD, NASH, фиброзом печени или алкогольными или неалкогольными заболеваниями печени, включая цирроз печени.

[0179] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят терапевтически эффективное количество любого одного или более РНКи-агентов против PNPLA3. Лечение субъекта может включать терапевтическое и/или профилактическое лечение. Субъекту вводят терапевтически эффективное количество любого одного или более

РНКи-агентов против PNPLA3. Субъектом может быть человек, пациент или пациентчеловек. Субъект может представлять собой взрослого, подростка, ребенка или младенца. Фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе, можно вводить человеку или животному.

5

10

15

20

25

30

[0180]РНКи-агенты против PNPLA3, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения по меньшей мере одного симптома у субъекта, имеющего заболевание или расстройство, связанное с PNPLA3, или имеющего заболевание или расстройство, которое по меньшей мере частично опосредовано экспрессией гена PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агенты против PNPLA3 используют для лечения или управления клиническим проявлением у субъекта, страдающего заболеванием или расстройством и в отношении которого можно обеспечить благоприятный эффект, по меньшей мере частично обусловленный или опосредованный снижением мРНК PNPLA3. Субъекту вводят терапевтически эффективное количество одного или более РНКи-агентов против PNPLA3 или композиций, содержащих РНКи-агент против PNPLA3, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают введение подлежащему лечению субъекту композиции, содержащей РНКи-агент против PNPLA3, как описано в настоящем документе. В других вариантах осуществления субъекту вводят профилактически эффективное количество одного или более описанных РНКи-агентов против PNPLA3, таким образом осуществляют лечение субъекта путем предотвращения или ингибирования по меньшей мере одного симптома.

[0181] В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложены способы лечения заболеваний, расстройств, состояний или патологических состояний, по меньшей мере частично опосредованных экспрессией гена PNPLA3, у нуждающегося в этом пациента, причем способы включают введение пациенту любого из PHКи-агентов против PNPLA3, описанных в настоящем документе.

[0182] В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена и/или концентрация мРНК гена PNPLA3 у субъекта, которому вводят описанный РНКи-агент против PNPLA3, снижены на по меньшей мере около 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более 99% по отношению к субъекту до введения РНКи-агента против PNPLA3 или к субъекту, не получающему РНКи-агент против PNPLA3. Уровень экспрессии генов и/или концентрация мРНК у субъекта могут быть снижены в клетке, группе клеток и/или

ткани субъекта. В некоторых вариантах осуществления экспрессию гена PNPLA3 ингибируют на по меньшей мере около 50%, 55%, 60%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70% или более чем 70% в цитоплазме гепатоцитов по сравнению с субъектом до введения PHКи-агента против PNPLA3 или субъекта, не получающего PHКи-агент против PNPLA3.

5

10

15

20

25

30

[0183] В некоторых вариантах осуществления уровень белка PNPLA3 у субъекта, которому вводили описанный PHKи-агент против PNPLA3, снижена на по меньшей мере около 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более 99% по отношению к субъекту до введения PHKи-агента против PNPLA3 или к субъекту, не получающему PHKи-агент против PNPLA3. Концентрация белка у субъекта может быть снижена в клетке, группе клеток, ткани, крови и/или другой текучей среде субъекта.

[0184] Снижение уровней мРНК PNPLA3 и уровней белка PNPLA3 можно оценить любыми способами, известными в данной области. В настоящем документе снижение или уменьшение уровня мРНК PNPLA3 и/или уровня белка в совокупности называется снижением или уменьшением PNPLA3 или ингибированием или снижением экспрессии PNPLA3. Примеры, приведенные в настоящем документе, иллюстрируют известные способы оценки ингибирования экспрессии гена PNPLA3. Специалисту в данной области дополнительно известны приемлемые способы оценки ингибирования экспрессии гена PNPLA3 *in vivo* и/или *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны [0185]способы лечения (включая профилактическое или превентивное лечение) заболеваний, расстройств или симптомов, вызванных NAFLD, NASH, фиброзом печени и/или алкогольными или неалкогольными заболеваниями печени, включая цирроз печени, причем способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества РНКи-агента против PNPLA3, включающего в себя антисмысловую нить, которая по меньшей мере частично комплементарна части мРНК PNPLA3, имеющей последовательность, представленную в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны способы лечения (включая профилактическое или превентивное лечение) заболеваний или симптомов, вызванных фиброзом печени и/или алкогольными или неалкогольными NAFLD, NASH, заболеваниями печени, включая цирроз печени, причем способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества РНКи-агента против PNPLA3, включая антисмысловую нить, имеющую последовательность по любой из последовательностей, представленных в таблице 2 или 3, и смысловую нить, содержащую любую из последовательностей, представленных в таблице 2 или 4, которая по меньшей мере частично комплементарна антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны способы лечения (включая профилактическое или превентивное лечение) заболеваний или симптомов, вызванных NAFLD, NASH, фиброзом печени и/или алкогольными или неалкогольными заболеваниями печени, включая цирроз печени, причем способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества РНКи-агента PNPLA3, включая смысловую нить, содержащую последовательностей, представленных в таблице 2 или 4, и антисмысловую нить, содержащую последовательность по любой из последовательностей, представленных в таблице 2 или 3, которая по меньшей мере частично комплементарна смысловой нити.

5

10

15

20

25

30

[0186] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны способы ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в клетке, причем способы включают введение в клетку РНКи-агента против RNPLA3, который включает антисмысловую нить, по меньшей мере частично комплементарную части мРНК PNPLA3, имеющей последовательность, представленную в таблице 1. В некоторых осуществления в настоящем документе описаны способы ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в клетке, причем способы включают введение в клетку РНКи-агента RNPLA3, который включает антисмысловую нить, против содержащую последовательность приведенную в таблицах 2 или 3, и смысловую нить, которая содержит любую из последовательностей, как показано в таблицах 2 или 4, которая по меньшей мере частично комплементарна антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны способы ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в клетке, причем способы включают введение РНКи-агента против PNPLA3, включая смысловую нить, которая содержит любую из последовательностей, приведенных в таблицах 2 или 4, и антисмысловую нить, которая содержит любую из последовательностей, приведенных в таблицах 2 или 3, которая по меньшей мере частично комплементарна смысловой нити.

[0187] Применение РНКи-агентов против PNPLA3 обеспечивает способы терапевтического (включая профилактическое) лечения заболеваний/расстройств, связанных с NAFLD, NASH, фиброзом печени, алкогольными или неалкогольными заболеваниями печени, включая цирроз печени, и/или усиленной или повышенной экспрессии PNPLA3. Описанные PHКи-агенты против PNPLA3 опосредуют PHК-

интерференцию для ингибирования экспрессии одного или более генов, необходимых для продукции белка PNPLA3. РНКи-агенты против PNPLA3 также можно применять для лечения или профилактики различных заболеваний, расстройств или состояний, включая NAFLD, NASH, фиброз печени и/или алкогольные или неалкогольные заболевания печени, включая цирроз печени. Дополнительно описаны композиции для доставки РНКи-агентов против PNPLA3 в клетки печени *in vivo*.

Клетки, ткани, органы и не относящиеся к человеку организмы

5

10

15

20

25

30

[0188] Предусмотрены клетки, ткани, органы и не относящиеся к человеку организмы, которые содержат по меньшей мере один из РНКи-агентов против PNPLA3, описанных в настоящем документе. Клетка, ткань, орган или не относящийся к человеку организм получают путем доставки РНКи-агента в клетку, ткань, орган или не относящийся к человеку организм.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0189] В настоящем документе представлены иллюстративные варианты осуществления описанной технологии. Эти варианты осуществления являются лишь иллюстративными и не ограничивают объем настоящего описания или прилагаемой формулы изобретения.

[0190] Вариант осуществления 1. РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена PNPLA3, содержащий:

антисмысловую нить, содержащую по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, отличающихся 0 или 1 нуклеотидом от любой из последовательностей SEQ ID NO: 46–87, 174–211 и 257–258; и смысловую нить, содержащую нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере частично комплементарна антисмысловой нити.

[0191] Вариант осуществления 2. РНКи-агент по варианту осуществления 1, в котором антисмысловая нить содержит нуклеотиды 2–18 любой из последовательностей SEQ ID NO: 46–87, 174–211 и 257–258.

[0192] Вариант осуществления 3. РНКи-агент по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, в котором смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность из по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, отличающихся 0

или 1 нуклеотидом от любой из последовательностей смысловой нити SEQ ID NO: 2–45 и 212–256, и при этом смысловая нить имеет область из 17 смежных нуклеотидов с по меньшей мере 85% комплементарностью к антисмысловой нити.

[0193] Вариант осуществления 4. РНКи-агент по любому из вариантов осуществления 1–3, причем по меньшей мере один нуклеотид РНКи-агента представляет собой модифицированный нуклеотид или включает в себя модифицированную межнуклеозидную связь.

5

10

15

20

30

[0194] Вариант осуществления 5. РНКи-агент по любому из вариантов осуществления 1–3, причем все или по существу все нуклеотиды в смысловой нити и/или антисмысловой нити РНКи-агента представляют собой модифицированные нуклеотиды.

[0195] Вариант осуществления 6. РНКи-агент по любому из вариантов осуществления 4—5, в котором модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из: 2'-О-метилнуклеотида, 2'-фторнуклеотида, 2'-дезоксинуклеотида, 2',3'-секо-нуклеотидного миметика, блокированного нуклеотида, 2'-F-арабинонуклеотида, 2'-метоксиэтилнуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, рибита, инвертированного нуклеотида, инвертированного 2'-О-метилнуклеотида, инвертированного 2'-дезоксинуклеотида, 2'-аминомодифицированного нуклеотида, 2'-алкилмодифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, винилфосфонат-содержащего нуклеотида и 3'-О-метилнуклеотида.

[0196] Вариант осуществления 7. РНКи-агент по варианту осуществления 5, в котором все или по существу все модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метилнуклеотиды, 2'-фторнуклеотиды или их комбинации.

25 **[0197]** Вариант осуществления 8. РНКи-агент по любому из вариантов осуществления 1–7, в котором антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представляющую собой любую из модифицированных последовательностей антисмысловой нити SEQ ID NO: 88–128.

[0198] Вариант осуществления 9. РНКи-агент по любому из вариантов осуществления 1—8, в котором смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность любой из модифицированных последовательностей смысловой нити SEQ ID NO: 129—173.

[0199] Вариант осуществления 10. РНКи-агент по варианту осуществления 1, в котором антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представляющую собой любую из модифицированных последовательностей SEQ ID NO: 88—128, а

- смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представляющую собой любую из модифицированных последовательностей SEQ ID NO: 129–173.
- [0200] Вариант осуществления 11. РНКи-агент по любому из вариантов осуществления 1–10, который связан с нацеливающим лигандом.
- 5 **[0201]** Вариант осуществления 12. РНКи-агент по варианту осуществления 11, причем нацеливающий лиганд содержит n-ацетилгалактозамин.
 - [0202] Вариант осуществления 13. РНКи-агент по варианту осуществления 11 или 12, причем нацеливающий лиганд имеет структуру (NAG37) или (NAG37)s.
 - [0203] Вариант осуществления 14. Способ по любому из вариантов осуществления 11—14, причем нацеливающий лиганд связан со смысловой нитью.

10

15

20

25

- [0204] Вариант осуществления 15. РНКи-агент по варианту осуществления 15, причем нацеливающий лиганд связан с 5'-концом смысловой нити.
- [0205] Вариант осуществления 16. РНКи-агент по любому из вариантов осуществления 1–16, в котором смысловая нить имеет длину от 18 до 30 нуклеотидов и антисмысловая нить имеет длину от 18 до 30 нуклеотидов.
- [0206] Вариант осуществления 17. РНКи-агент по варианту осуществления 17, в котором каждая из смысловой нити и антисмысловой нити имеет длину от 18 до 27 нуклеотидов.
- [0207] Вариант осуществления 18. РНКи-агент по варианту осуществления 18, в котором каждая из смысловой нити и антисмысловой нити имеет длину от 18 до 24 нуклеотидов.
- [0208] Вариант осуществления 19. РНКи-агент по варианту осуществления 19, в котором каждая из смысловой нити и антисмысловой нити имеет длину 21 нуклеотид.
- [0209] Вариант осуществления 20. РНКи-агент по любому из вариантов осуществления 17–20, имеющий два тупых конца.
- [0210] Вариант осуществления 21. РНКи-агент по любому из вариантов осуществления 1–21, в котором смысловая нить содержит один или два концевых кэпа.
- [0211] Вариант осуществления 22. РНКи-агент по любому из вариантов осуществления 1–22, в котором смысловая нить содержит один или два инвертированных лишенных азотистого основания остатка.
- [0212] Вариант осуществления 23. РНКи-агент по варианту осуществления 1, причем РНКи-агент состоит из смысловой нити и антисмысловой нити, которые образуют дуплексную последовательность любого из дуплексов с SEQ ID NO, как указано в таблице 5В.

- [0213] Вариант осуществления 24. РНКи-агент по любому из вариантов осуществления 1–23, в котором смысловая нить дополнительно включает инвертированные лишенные азотистого основания остатки на 3'-конце нуклеотидной последовательности и/или на 5'-конце нуклеотидной последовательности.
- [0214] Вариант осуществления 25. РНКи-агент по варианту осуществления 1, содержащий антисмысловую нить, которая содержит, состоит из или по существу состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности, которая отличается 0 или 1 нуклеотидом одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 88–128, причем а, с, g и и представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно; Аf, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно; s представляет собой фосфоротиоатную связь; и при этом все или по существу все нуклеотиды смысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.
 - [0215] Вариант осуществления 26. РНКи-агент по варианту осуществления 1, в котором смысловая нить содержит, состоит из или по существу состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности, которая отличается 0 или 1 нуклеотидом от одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 129–173, причем а, с, g, i и и представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин, инозин и уридин соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно; s представляет собой фосфоротиоатную связь; и при этом все или по существу все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

15

20

25

- [0216] Вариант осуществления 27. РНКи-агент по любому из вариантов осуществления 24—26, в котором смысловая нить дополнительно включает инвертированные лишенные азотистого основания остатки на 3'-конце нуклеотидной последовательности и/или на 5'-конце нуклеотидной последовательности.
- [0217] Вариант осуществления 28. РНКи-агент по любому из вариантов осуществления 24–27, причем смысловая нить РНКи-агента связана с нацеливающим лигандом.
- [0218] Вариант осуществления 29. РНКи-агент по варианту осуществления 28, причем нацеливающий лиганд имеет аффинность к рецептору асиалогликопротеинов.
- [0219] Вариант осуществления 30. РНКи-агент по варианту осуществления 29, причем нацеливающий лиганд содержит N-ацетилгалактозамин.
- [0220] Вариант осуществления 31. РНКи-агент по варианту осуществления 1, причем нацеливающий лиганд содержит:

[0221] Вариант осуществления 32. РНКи-агент по варианту осуществления 1, в котором антисмысловая нить состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 88–128, а смысловая нить состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 129–173, причем а, с, g и и представляют собой 2′-О-

метиладенозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно; s представляет собой фосфоротиоатную связь; (invAb) представляет собой инвертированный лишенный азотистого основания остаток дезоксирибозы; и (NAG37)s имеет следующую химическую структуру:

5

10

20

[0222] Вариант осуществления 33. Композиция, содержащая РНКи-агент по любому из вариантов осуществления 1—32, причем композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0223] Вариант осуществления 34. Способ ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в клетке, включающий введение в клетку эффективного количества РНКи-агента по любому из вариантов осуществления 1—32 или композиции по любому из вариантов осуществления 33.

15 **[0224]** Вариант осуществления 35. Способ по варианту осуществления 34, в котором клетка находится внутри субъекта.

[0225] Вариант осуществления 36. Способ по варианту осуществления 35, в котором субъект представляет собой человеческий индивид.

[0226] Вариант осуществления 37. Способ по любому из вариантов осуществления 34—36, в котором экспрессию гена PNPLA3 ингибируют на по меньшей мере около 30%.

[0227] Вариант осуществления 38. Способ лечения заболевания или расстройства, связанного с PNPLA3, включающий введение нуждающемуся в этом человеческому индивиду терапевтически эффективного количества композиции по варианту осуществления 33.

5 **[0228]** Вариант осуществления 39. Способ по варианту осуществления 38, в котором заболевание представляет собой NAFLD, NASH, фиброз печени, алкогольную жировую дистрофию печени или цирроз печени.

[0229] Вариант осуществления 40. Способ по любому из вариантов осуществления 34—39, в котором РНКи-агент вводят в дозе от около 0,05 мг/кг до около 5,0 мг/кг массы тела человеческого индивида.

[0230] Вариант осуществления 41. Способ по любому из вариантов осуществления 34–40, в котором РНКи-агент вводят двумя или более дозами.

[0231] Вариант осуществления 42. Применение РНКи-агента по любому из вариантов осуществления 1–32 или композиции по варианту осуществления 33 для лечения заболевания, расстройства или симптома, по меньшей мере частично опосредованных экспрессией гена PNPLA3.

[0232] Вариант осуществления 43. Применение по варианту осуществления 42, причем симптом представляет собой цирроз печени.

[0233] Вариант осуществления 44. Применение РНКи-агента по любому из вариантов осуществления 1–32 или композиции по варианту осуществления 33 для приготовления фармацевтических композиций для лечения заболевания, расстройства или симптома, по меньшей мере частично опосредованного экспрессией гена PNPLA3.

[0234] Вариант осуществления 45. Применение РНКи-агента по любому из вариантов осуществления 42—44, причем заболевание представляет собой NAFLD, NASH, фиброз печени или алкогольное или неалкогольное заболевание печени, такое как цирроз печени.

[0235] Вариант осуществления 46. Применение композиции по варианту осуществления 33, причем РНКи-агент вводят в дозе от около 0,05 мг/кг до около 5,0 мг/кг массы тела человеческого индивида.

[0236] Представленные выше варианты осуществления и элементы показаны вместе со следующими не имеющими ограничительного характера примерами.

30

10

15

20

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. Синтез РНКи-агентов против PNPLA3

[0237] Приведенные в таблицах 5A и 5B дуплексы РНКи-агентов против PNPLA3 синтезировали, как описано ниже.

А. Синтез

5

10

15

20

25

30

[0238] Смысловые и антисмысловые нити РНКи-агентов синтезировали по амидофосфитной технологии с использованием твердой фазы, применяемой при синтезе олигонуклеотидов. Такой стандартный синтез общеизвестен в данной области. В зависимости от масштаба использовали оборудование либо MerMade96E® (BioAutomation), либо MerMade12® (BioAutomation), либо OP Pilot 100 (GE Healthcare). Синтез проводили на твердой подложке, изготовленной из стекла с контролируемой пористостью (СКП, 500 Å или 600Å, производства Prime Synthesis, Aston, PA, США). Мономер, расположенный на 3'-конце соответствующей нити, прикрепляли к твердой подложке в качестве исходной точки для синтеза. Все РНК и 2'-модифицированные амидофосфиты РНК были приобретены у Thermo Fisher Scientific (Milwaukee, WI, США) или Hongene Biotech (Shanghai, КНР). 2'-О-метилфосфорамидиты включали следующие: $(5'-O-диметокситритил-N^6-(бензоил)-2'-O-метиладенозин-3'-O-(2$ цианоэтил-N,N-диизопропиламино)амидофосфит, 5'-O-диметокситритил-N⁴-(ацетил)-2'-О-метилцитидин-3'-О-(2-цианоэтил-N, N-диизопропиламино)амидофосфит, (5'-Одиметокситритил- N^2 -(изобутирил)-2'-О-метилгуанозин-3'-О-(2-цианоэтил-N,Nдиизопропиламино)амидофосфит и 5'-О-диметокситритил-2'-О-метилуридин-3'-О-(2цианоэтил-N, N-диизопропиламино) амидофосфит. 2'-Дезокси-2'-фторамидофосфиты содержали те же защитные группы, что и 2'-О-метиламидиты. 5'- (4,4'-

Диметокситритил) -2',3'-секо-уридин, 2'-бензоил-3'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]-фосфорамидит также приобретали в Thermo Fisher Scientific или Hongene Biotech. 5'-Диметокситритил-2'-О-метилинозин-3'-О- (2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино) фосфорамидиты были приобретены в Glen Research (Virginia) или Hongene Biotech. Инвертированные лишенные азотистых оснований (3'-О-

диметокситритил-2'-дезоксирибизо-5'-O-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино) амидофосфиты приобретали в ChemGenes (Wilmington, MA, США) или SAFC (St Louis, MO, США). 5'-О-диметокситритил-N 2 , N 6 -(феноксиацетат)-2'-О-метилдиаминопурин-3'-О- (2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино) фосфорамидиты приобретали в ChemGenes или Hongene Biotech.

[0239] Содержащие нацеливающий лиганд амидофосфиты растворяли в безводном дихлорметане или безводном ацетонитриле (50 мМ), тогда как все остальные амидиты растворяли в безводном ацетонитриле (50 мМ) или безводном диметилформамиде и добавляли молекулярные сита (3Å). В качестве активирующего раствора использовали 5-бензилтио-1H-тетразол (ВТТ, 250 мМ в ацетонитриле) или 5-этилтио-1H-тетразол (ЕТТ, 250 мМ в ацетонитриле). Продолжительность связывания составляла 12 мин (РНК), 15 мин (нацеливающий лиганд), 90 с (2'ОМе) и 60 с (2'F). Для введения фосфоротиоатных связей использовали 100 мМ раствор 3-фенил-1,2,4-диотиазолин-5-она (РОЅ, приобретенного у PolyOrg, Inc., Leominster, MA, США) в безводном ацетонитриле. Если специально не указано иное, РНКи-агент, не имеющий нацеливания на лиганд, не содержит нацеливающего лиганда, каждый из дуплексов РНКи-агентов против PNPLA3 синтезируется и тестируется в следующих примерах с использованием N-ацетилгалактозамина в качестве NAG в нацеливающих лиганд-химических структурах, представленных в таблице 6.

В. Расщепление и снятие защиты со связанного с подложкой олигомера [0240] После завершения твердофазного синтеза высушенную твердую подложку обрабатывали 1 : 1 объемом 40% масс. раствора метиламина в воде и 28% масс. раствора гидроксида аммония (Aldrich) в течение 1,5 часа при 30 °C. Раствор выпаривали и твердый остаток разводили в воде (см. ниже).

20 *C.* Очистка

5

10

25

30

[0241] Неочищенные олигомеры очищали методом анионообменной ВЭЖХ с использованием колонки TSKgel SuperQ 5PW 13 мкм и системы Shimadzu LC-8. Буферный раствор А (рН 9,0) состоял из 20 мМ трис, 5 мМ ЭДТА и содержал 20% ацетонитрила, буферный раствор В имел такой же состав, что и буферный раствор А, но с добавлением 1,5 М хлорида натрия. Были записаны УФ-спектры при 260 нм. Соответствующие фракции объединяли и анализировали методом эксклюзионной ВЭЖХ с использованием колонки производства ХК 26/40 GE Healthcare, заполненной Sephadex G-25 с подвижным буферным раствором, состоящим из фильтрованной деионизированной (DI) воды или 100 мМ бикарбоната аммония (рН 6,7) и 20% ацетонитрила.

D. Отэкиг

[0242] Для получения РНКи-агентов комплементарные нити смешивали объединением эквимолярных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в 1× фосфатно-солевом буферном растворе (Corning, Cellgro). Некоторые РНКи-агенты

лиофилизировали и хранили при температуре от -15 до -25 °C. Концентрацию дуплекса определяли, измеряя оптическое поглощение раствора на УФ-Вид спектрометре в $1\times$ фосфатно-солевом буферном растворе. Затем для определения концентрации дуплекса оптическое поглощение раствора при 260 нм умножали на коэффициент пересчета и коэффициент разбавления. Использованный коэффициент превращения составлял либо 0,050 мг/(мл·см), либо его рассчитывали по экспериментально определенному коэффициенту экстинкции.

Пример 2. Мышиная модель PNPLA3-SEAP

5

10

15

20

25

30

Для оценки некоторых РНКи-агентов против PNPLA3 использовали мышиную модель PNPLA3-SEAP. Самок мышей-альбиносов C57BL/6 или мышей ICR в возрасте от шести до восьми недель, в зависимости от доступности, временно трансфицировали *in vivo* плазмидой путем гидродинамической инъекции в хвостовую вену, применяемой по меньшей мере за 29 дней до введения РНКи-агента против PNPLA3 или контроля. Получали два типа плазмид SEAP. Первая плазмида содержит последовательность кДНК PNPLA3 человека (GenBank NM 025225.2 (SEQ ID NO:1)), вставленную в 3'-UTR репортерного гена SEAP (секретируемая плацентарная щелочная фосфатаза человека). Из-за очевидной нестабильности полного транскрипта с течением времени была синтезирована вторая плазмида, которая включала усеченную версию последовательности кДНК PNPLA3 человека (в частности, нуклеотиды 501--2210, GenBank NM 025225.2). Для трансфекции мышей выбирали одну из двух плазмид. Для создания мышиной модели PNPLA3-SEAP мышам в хвостовую вену вводили 50 мкг соответствующей плазмиды в растворе Рингера (в общем объеме 10% массы тела животного). Раствор вводили в течение 5-7 секунд через иглу калибра 27, как описано ранее (Zhang G et al., High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injection of naked plasmid DNA. Human Gene Therapy 1999 Vol. 10, p1735–1737.). Ингибирование экспрессии PNPLA3 РНКи-агентом против PNPLA3 приводит к сопутствующему ингибированию экспрессии SEAP, которое измеряют. Перед введением препарата (в период от дня -7 до дня 1 до введения дозы) уровни экспрессии SEAP в сыворотке измеряли с помощью системы анализа репортерных генов SEAP Phospha-LightTM SEAP Reporter Gene Assay System (Invitrogen) и мышей группировали в соответствии со средними уровнями SEAP.

[0244] Мышей анестезировали 2–3% изофлураном и из подчелюстной области отбирали пробы крови в пробирки для отделения сыворотки (Sarstedt AG & Co., г.

Nümbrecht, Германия). В течение 20 мин крови давали коагулировать при температуре окружающей среды. Для отделения сыворотки пробирки центрифугировали в течение 3 мин при 8000× g и хранили при 4 °C. Сыворотку собирали и измеряли с помощью системы анализа репортерных генов SEAP Phospha-LightTM SEAP Reporter Gene Assay System (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Для учета не связанного с лечением снижения экспрессии PNPLA3 в этой модели, сывороточный уровень SEAP у каждого животного можно нормировать к контрольной группе мышей, получавшей контроль — несущую среду. Для этого, сначала, с целью определения соотношения экспрессии «нормированной к уровню до лечения», величину уровня SEAP для каждого животного в данный момент времени разделяли на уровень экспрессии у этого животного до лечения (день -1). Затем экспрессию в конкретный момент времени нормировали к уровню контрольной группы делением соотношения «нормированная к уровню до лечения» для отдельного животного на среднее соотношение «нормированная к уровню до лечения» для всех мышей в группе нормального контроля — несущей среды. В альтернативном варианте осуществления уровни SEAP в сыворотке для каждого животного оценивали путем нормирования только к уровням до лечения.

5

10

15

20

25

Пример 3. Тестирование РНКи-агентов против PNPLA3 in vivo на мышах PNPLA3-SEAP

[0245] Использовали мышиную модель PNPLA3-SEAP, описанную в примере 2 выше, полученную с применением плазмиды, содержащей полноразмерный транскрипт PNPLA3 человека. В день 1 каждой мыши однократно подкожно вводили раствор, содержащий либо 3,0 мг/кг (mpk) PHКи-агента против PNPLA3, приготовленного в физрастворе, либо контроль — несущую среду (физраствор без PHКи-агента), в дозе 200 мкл/20 г массы тела животного в соответствии со следующей таблицей 7.

Таблица 7. Целевые положения и группы введения из примера 3

Группа	Целевая позиция в гене (в SEQ ID NO: 1)	РНКи-агент и доза	Режим дозирования
1	Н/П	Физраствор (без	Одиночная инъекция в
		РНКи-агента)	день 1
2	688	3,0 мг/кг Ј1Д00001	Одиночная инъекция в
			день 1
3	688	3,0 мг/кг Ј1D00002	Одиночная инъекция в
			день 1

Группа	Целевая позиция в гене (в SEQ ID NO: 1)	РНКи-агент и доза	Режим дозирования
4	1586	3,0 мг/кг Ј1D00004	Одиночная инъекция в день 1
5	2180	3,0 мг/кг Ј1D00008	Одиночная инъекция в день 1
6	1179	3,0 мг/кг Ј1D00010	Одиночная инъекция в день 1
7	1179	3,0 мг/кг Ј1D00011	Одиночная инъекция в день 1
8	571	3,0 мг/кг J1D00012	Одиночная инъекция в день 1
9	1745	3,0 мг/кг Ј1D00016	Одиночная инъекция в день 1

5

10

15

20

Каждый из РНКи-агентов против PNPLA3 включал модифицированные [0246] которые были конъюгированы на 5'-конце смысловой нити с нуклеотиды, нацеливающим лигандом, который включал три группы N-ацетилгалактозамина (трехзубчатый модифицированные лиганд), включая последовательности, обозначенные в дуплексных структурах в настоящем документе. (см. таблицы 3-5, где представлены конкретные модификации и информация о структуре, относящиеся к РНКи-агентам против PNPLA3, включая лиганд (NAG37)s). РНКи-агенты против PNPLA3 J1D00001 (группа 2) и J1D00002 (группа 3) включали нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 688 гена; РНКи-агент против PNPLA3 J1D00004 (группа 4) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 1586 гена; РНКи-агент против PNPLA3 J1D00008 (группа 5) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 2180 гена; РНКи-агенты против PNPLA3 J1D00010 (группа 6) и J1D00011 (группа 7) включали нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 1179 гена; РНКи-агент против PNPLA3 J1D00012 (группа 8) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 571 гена; PNPLA3 J1D00016 (группа 9) включал РНКи-агент против нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 1745 гена; (См., например, SEQ ID NO:1 и таблицу 2 для указанного гена PNPLA3).

[0247] Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т. е. инъекции были подкожными) в вялую кожу в области шеи и плеч. Исследовали по 4 (четыре) мыши в каждой группе (n = 4). Сыворотку собирали в день -1 (перед лечением), день 8, день 15, день 22 и день 29 и определяли уровни экспрессии SEAP в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Данные эксперимента показаны в следующих таблицах 8 и 9.

Таблица 8. Средняя экспрессия SEAP, нормализованная к уровню до лечения (день -1) у трансфицированных полноразмерным транскриптом мышей PNPLA3-SEAP из примера 3

	Де	ень 8	Де	нь 15	Ден	њ 22
ИД группы	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)
Группа 1 (несущая среда — физраствор)	0,402	0,136	0,398	0,097	0,285	0,159
Группа 2 (3,0 мг/кг J1D00001)	0,325	0,120	0,260	0,129	0,144	0,068
Группа 3 (3,0 мг/кг J1D00002)	0,279	0,076	0,237	0,114	0,174	0,019
Группа 4 (3,0 мг/кг J1D00004)	0,186	0,055	0,145	0,065	0,073	0,038
Группа 5 (3,0 мг/кг J1D00008)	0,160	0,027	0,115	0,034	0,073	0,026
Группа 6 (3,0 мг/кг J1D00010)	0,298	0,054	0,299	0,104	0,203	0,084
Группа 7 (3,0 мг/кг J1D00011)	0,264	0,052	0,194	0,077	0,095	0,054
Группа 8 (3,0 мг/кг J1D00012)	0,170	0,047	0,159	0,053	0,113	0,045
Группа 9 (3,0 мг/кг J1D00016)	0,302	0,108	0,246	0,079	0,162	0,054

^{*} Как отмечено выше в примере 2, постепенное снижение SEAP в группе контроля — несущей среды (группа 1) с течением времени связано с потерей репортерного гена SEAP в клетках мышей вследствие естественной репликации клеток у животных и не является результатом влияния какого-либо ингибирующего соединения.

Таблица 9. Средняя экспрессия SEAP, нормализованная к уровню до лечения (день -1) и контролю — несущей среде у трансфицированных полноразмерным транскриптом мышей PNPLA3-SEAP из примера 3

	Де	ень 8	Де	нь 15	Д	ень 22
ИД группы	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)
Группа 1 (несущая среда — физраствор)	1,000	0,339	1,000	0,244	1,000	0,558
Группа 2 (3,0 мг/кг J1D00001)	0,809	0,298	0,655	0,325	0,505	0,240
Группа 3 (3,0 мг/кг J1D00002)	0,693	0,190	0,597	0,288	0,610	0,067
Группа 4 (3,0 мг/кг J1D00004)	0,462	0,136	0,365	0,163	0,258	0,132
Группа 5 (3,0 мг/кг J1D00008)	0,399	0,066	0,289	0,085	0,257	0,092
Группа 6 (3,0 мг/кг J1D00010)	0,742	0,133	0,751	0,262	0,715	0,296
Группа 7 (3,0 мг/кг J1D00011)	0,657	0,130	0,487	0,194	0,332	0,189
Группа 8 (3,0 мг/кг J1D00012)	0,422	0,117	0,399	0,133	0,397	0,157
Группа 9 (3,0 мг/кг J1D00016)	0,752	0,270	0,619	0,198	0,567	0,188

Пример 4. Тестирование РНКи-агентов против PNPLA3 in vivo на мышах PNPLA3-SEAP

[0248] Использовали мышиную модель PNPLA3-SEAP, описанную в примере 2 выше, полученную с применением плазмиды, содержащей полноразмерный транскрипт PNPLA3 человека. В день 1 каждой мыши однократно подкожно вводили раствор, содержащий либо 3,0 мг/кг (mpk) PHКи-агента против PNPLA3, приготовленного в физрастворе, либо контроль — несущую среду (физраствор без PHКи-агента), в дозе 200 мкл/20 г массы тела животного в соответствии со следующей таблицей 10.

Таблица 10. Целевые положения и группы введения из примера 4

5

10

15

20

Группа	Целевая позиция в гене (в SEQ ID NO: 1)	РНКи-агент и доза	Режим дозирования
1	Н/П	Физраствор (без РНКи-агента)	Одиночная инъекция в день 1
2	2180	3,0 мг/кг J1D00008	Одиночная инъекция в день 1
3	886	3,0 мг/кг J1D00014	Одиночная инъекция в день 1
4	1584	3,0 мг/кг J1D00015	Одиночная инъекция в день 1
5	553	3,0 мг/кг J1D00021	Одиночная инъекция в день 1
6	680	3,0 мг/кг J1D00022	Одиночная инъекция в день 1
7	1182	3,0 мг/кг J1D00005	Одиночная инъекция в день 1
8	746	3,0 мг/кг J1D00024	Одиночная инъекция в день 1

Каждый из РНКи-агентов против PNPLA3 включал модифицированные [0249] которые были конъюгированы на 5'-конце смысловой нити с нацеливающим лигандом, который включал три группы N-ацетилгалактозамина (трехзубчатый модифицированные лиганд), включая последовательности, обозначенные в дуплексных структурах в настоящем документе. (См. таблицы 3-5, где представлены конкретные модификации и информация о структуре, относящиеся к РНКи-агентам против PNPLA3, включая лиганд (NAG37)s). РНКи-агент против PNPLA3 J1D00008 (группа 2) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 2180 гена; РНКи-агент против PNPLA3 J1D00014 (группа 3) включал нуклеотидные

последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 886 гена; РНКи-агент против PNPLA3 J1D00015 (группа 4) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 1584 гена; РНКи-агент против PNPLA3 J1D00021 (группа 5) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 553 гена; РНКи-агент против PNPLA3 J1D00022 (группа 6) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 680 гена; РНКи-агент против PNPLA3 J1D00005 (группа 7) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 1182 гена; и РНКи-агент против PNPLA3 J1D00024 (группа 8) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 746 гена. (См., например, SEQ ID NO:1 и таблицу 2 для указанного гена PNPLA3).

5

10

15

20

[0250] Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т. е. инъекции были подкожными) в вялую кожу в области шеи и плеч. Исследовали по 4 (четыре) мыши в каждой группе (n = 4). Сыворотку собирали в день -1 (перед лечением), день 8, день 15, день 22 и день 29 и определяли уровни экспрессии SEAP в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Данные эксперимента показаны в следующих таблицах 11 и 12.

Таблица 11. Средняя экспрессия SEAP, нормализованная к уровню до лечения (день -1) у трансфицированных полноразмерным транскриптом мышей PNPLA3-SEAP из примера 4

	День 8		Деі	нь 15	День 22	
ИД группы	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)
Группа 1 (несущая среда — физраствор)	0,857	0,471	1,737	0,769	0,260	0,148
Группа 2 (3,0 мг/кг J1D00008)	0,344	0,128	0,679	0,375	0,095	0,044
Группа 3 (3,0 мг/кг J1D00014)	1,221	0,267	2,307	0,878	0,363	0,192
Группа 4 (3,0 мг/кг J1D00015)	0,424	0,078	0,885	0,279	0,130	0,030
Группа 5 (3,0 мг/кг J1D00021)	0,832	0,299	1,891	0,903	0,320	0,141
Группа 6 (3,0 мг/кг J1D00022)	0,527	0,259	1,223	0,547	0,190	0,097
Группа 7 (3,0 мг/кг J1D00005)	0,817	0,323	1,291	0,618	0,235	0,149
Группа 8 (3,0 мг/кг J1D00024)	0,700	0,143	2,079	0,821	0,470	0,207

^{*} Как отмечено выше в примере 2, постепенное снижение SEAP в группе контроля — несущей среды (группа 1) с течением времени связано с потерей репортерного гена SEAP в клетках мышей вследствие естественной репликации клеток у животных и не является результатом влияния какого-либо ингибирующего соединения.

Таблица 12. Средняя экспрессия SEAP, нормализованная к уровню до лечения (день -1) и контролю — несущей среде у трансфицированных полноразмерным транскриптом мышей PNPLA3-SEAP из примера 4

	Де	ень 8	День 15		День 22	
ИД группы	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)
Группа 1 (несущая среда — физраствор)	1,000	0,550	1,000	0,443	1,000	0,568
Группа 2 (3,0 мг/кг J1D00008)	0,401	0,149	0,391	0,216	0,367	0,170
Группа 3 (3,0 мг/кг J1D00014)	1,426	0,312	1,328	0,505	1,397	0,737
Группа 4 (3,0 мг/кг J1D00015)	0,495	0,091	0,510	0,160	0,500	0,117
Группа 5 (3,0 мг/кг J1D00021)	0,971	0,349	1,089	0,520	1,231	0,541
Группа 6 (3,0 мг/кг J1D00022)	0,615	0,302	0,704	0,315	0,732	0,371
Группа 7 (3,0 мг/кг J1D00005)	0,954	0,377	0,743	0,356	0,905	0,574
Группа 8 (3,0 мг/кг J1D00024)	0,817	0,167	1,197	0,473	1,808	0,796

Пример 5. Тестирование РНКи-агентов против PNPLA3 in vivo на мышах PNPLA3-SEAP

[0251] Использовали мышиную модель PNPLA3-SEAP, как описано в примере 2 выше, с применением плазмиды, содержащей усеченную версию транскрипта PNPLA3 человека. В день 1 каждой мыши однократно подкожно вводили раствор, содержащий либо 3,0 мг/кг (mpk) PHKи-агента против PNPLA3, приготовленного в физрастворе, либо контроль — несущую среду (физраствор без PHKи-агента), в дозе 200 мкл/20 г массы тела животного в соответствии со следующей таблицей 13.

Таблица 13. Целевые положения и группы введения из примера 5

5

10

15

Группа	Целевая позиция в гене (в SEQ ID NO: 1)	РНКи-агент и доза	Режим дозирования
1	Н/П	Физраствор (без РНКи- агента)	Одиночная инъекция в день 1
2	571	3,0 мг/кг J1D00012	Одиночная инъекция в день 1
3	571	3,0 мг/кг Ј1D00027	Одиночная инъекция в день 1
4	571	3,0 мг/кг Ј1D00028	Одиночная инъекция в день 1
5	571	3,0 мг/кг Ј1D00029	Одиночная инъекция в день 1
6	1179	3,0 мг/кг Ј1D00011	Одиночная инъекция в день 1
7	1179	3,0 мг/кг Ј1D00017	Одиночная инъекция в день 1
8	1586	3,0 мг/кг Ј1D00004	Одиночная инъекция в день 1
9	1586	3,0 мг/кг Ј1D00003	Одиночная инъекция в день 1
10	1586	3,0 мг/кг Ј1D00041	Одиночная инъекция в день 1
11	2180	3,0 мг/кг J1D00008	Одиночная инъекция в день 1

[0252] Каждый из РНКи-агентов против PNPLA3 включал модифицированные нуклеотиды, которые были конъюгированы на 5'-конце смысловой нити с нацеливающим лигандом, который включал три группы N-ацетилгалактозамина (трехзубчатый лиганд), включая модифицированные последовательности, обозначенные в дуплексных структурах в настоящем документе. (См. таблицы 3–5, где представлены конкретные модификации и информация о структуре, относящиеся к РНКи-агентам против PNPLA3, включая лиганд (NAG37)s). Каждый из РНКи-агентов против PNPLA3, J1D00012 (группа 2), J1D00027 (группа 3), J1D00028 (группа 4),

Ј1D00029 (группа 5), включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 571 гена; РНКи-агенты против PNPLA3 Ј1D00011 (группа 6) и Ј1D00017 (группа 7) включали нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 1179 гена; РНКи-агенты против PNPLA3 Ј1D00004 (группа 8), Ј1D00003 (группа 9) и Ј1D00041 (группа 10) включали нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 1586 гена; и РНКи-агент против PNPLA3 Ј1D00008 (группа 11) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 2180 гена. (См., например, SEQ ID NO:1 и таблицу 2 для указанного гена PNPLA3).

[0253] Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т. е. инъекции были подкожными) в вялую кожу в области шеи и плеч. Исследовали по 4 (четыре) мыши в каждой группе (n = 4). Сыворотку собирали в день -1 (перед лечением), день 8, день 15, день 22 и день 29 и определяли уровни экспрессии SEAP в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Данные эксперимента показаны в следующих таблицах 14 и 15.

Таблица 14. Средняя экспрессия SEAP, нормализованная к уровню до лечения (день -1) у мышей с усеченным транскриптом PNPLA3-SEAP из примера 5

	День 8		Ден	ь 15	Ден	ь 22	День 29	
ИД группы	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)
Группа 1 (несущая среда — физраствор)	0,772	0,173	0,746	0,164	0,446	0,258	0,677	0,725
Группа 2 (3,0 мг/кг J1D00012)	0,150	0,073	0,109	0,056	0,130	0,063	0,235	0,151
Группа 3 (3,0 мг/кг J1D00027)	0,132	0,104	0,132	0,084	0,199	0,126	0,249	0,190
Группа 4 (3,0 мг/кг J1D00028)	0,190	0,078	0,194	0,083	0,294	0,074	0,328	0,089
Группа 5 (3,0 мг/кг J1D00029)	0,173	0,090	0,108	0,035	0,090	0,033	0,161	0,107
Группа 6 (3,0 мг/кг J1D00011)	0,296	0,138	0,192	0,138	0,175	0,061	0,279	0,069
Группа 7 (3,0 мг/кг J1D00017)	0,204	0,113	0,085	0,049	0,151	0,054	0,317	0,088
Группа 8 (3,0 мг/кг J1D00004)	0,073	0,058	0,066	0,094	0,083	0,120	0,141	0,198
Группа 9 (3,0 мг/кг J1D00003)	0,065	0,018	0,026	0,007	0,024	0,007	0,039	0,008
Группа 10 (3,0 мг/кг J1D00041)	0,079	0,034	0,037	0,029	0,060	0,039	0,073	0,018
Группа 11 (3,0 мг/кг J1D00008)	0,142	0,048	0,091	0,071	0,216	0,235	0,285	0,219

^{*} Как отмечено выше в примере 2, постепенное снижение SEAP в группе контроля — несущей среды (группа 1) с течением времени связано с потерей репортерного гена SEAP в клетках мышей вследствие естественной репликации клеток у животных и не является результатом влияния какого-либо ингибирующего соединения.

Таблица 15. Средняя экспрессия SEAP, нормализованная к уровню до лечения (день -1) и контролю — несущей среде у мышей с усеченным транскриптом PNPLA3-SEAP из примера 5

	Де	День 8		ь 15	Ден	ь 22	День 29	
ИД группы	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)
Группа 1 (несущая среда — физраствор)	1,000	0,224	1,000	0,220	1,000	0,578	1,000	1,071
Группа 2 (3,0 мг/кг J1D00012)	0,194	0,094	0,146	0,075	0,290	0,142	0,346	0,222
Группа 3 (3,0 мг/кг J1D00027)	0,172	0,134	0,177	0,113	0,445	0,283	0,368	0,280
Группа 4 (3,0 мг/кг J1D00028)	0,246	0,101	0,260	0,112	0,659	0,167	0,484	0,131
Группа 5 (3,0 мг/кг J1D00029)	0,225	0,117	0,145	0,047	0,203	0,074	0,237	0,158
Группа 6 (3,0 мг/кг J1D00011)	0,383	0,179	0,257	0,185	0,391	0,136	0,412	0,101
Группа 7 (3,0 мг/кг J1D00017)	0,265	0,147	0,114	0,066	0,339	0,120	0,467	0,129
Группа 8 (3,0 мг/кг J1D00004)	0,095	0,075	0,089	0,126	0,186	0,268	0,208	0,293
Группа 9 (3,0 мг/кг J1D00003)	0,084	0,023	0,035	0,010	0,054	0,015	0,057	0,012
Группа 10 (3,0 мг/кг J1D00041)	0,094	0,041	0,048	0,037	0,126	0,081	0,102	0,025
Группа 11 (3,0 мг/кг J1D00008)	0,169	0,057	0,119	0,092	0,451	0,491	0,397	0,305

[0254] Каждый из РНКи-агентов против PNPLA3 в каждой из групп введения (т. е. группы 2–11) показал снижение экспрессии SEAP по сравнению с контролем, получавшим контроль — несущую среду (группа 1), во всех измеренных временных точках.

Пример 6. Тестирование РНКи-агентов против PNPLA3 in vivo на мышах PNPLA3-SEAP

[0255] Использовали мышиную модель PNPLA3-SEAP, как описано в примере 2 выше, с применением плазмиды, содержащей усеченную версию транскрипта PNPLA3 человека. В день 1 каждой мыши однократно подкожно вводили раствор, содержащий либо 3,0 мг/кг (mpk) PHКи-агента против PNPLA3, приготовленного в физрастворе, либо контроль — несущую среду (физраствор без PHКи-агента), в дозе 200 мкл/20 г массы тела животного в соответствии со следующей таблицей 16.

Таблица 16. Целевые положения и группы введения из примера 6

5

10

15

Группа	Целевая позиция в гене (в SEQ ID NO: 1)	РНКи-агент и доза	Режим дозирования
1	Н/П	Физраствор (без РНКи- агента)	Одиночная инъекция в день 1
2	2180	3,0 мг/кг J1D00008	Одиночная инъекция в день 1
3	2180	3,0 мг/кг Ј1D00046	Одиночная инъекция в день 1
4	2180	3,0 мг/кг Ј1D00047	Одиночная инъекция в день 1
5	2180	3,0 мг/кг Ј1D00048	Одиночная инъекция в день 1
6	1179	3,0 мг/кг Ј1D00011	Одиночная инъекция в день 1
7	1179	3,0 мг/кг Ј1D00043	Одиночная инъекция в день 1
8	1179	3,0 мг/кг Ј1D00044	Одиночная инъекция в день 1
9	1179	3,0 мг/кг J1D00045	Одиночная инъекция в день 1
10	544	3,0 мг/кг Ј1D00020	Одиночная инъекция в день 1
11	1195	3,0 мг/кг J1D00026	Одиночная инъекция в день 1

[0256] Каждый из РНКи-агентов против PNPLA3 включал модифицированные нуклеотиды, которые были конъюгированы на 5'-конце смысловой нити с нацеливающим лигандом, который включал три группы N-ацетилгалактозамина

(трехзубчатый модифицированные лиганд), включая последовательности, обозначенные в дуплексных структурах в настоящем документе. (См. таблицы 3-5, где представлены конкретные модификации и информация о структуре, относящиеся к РНКи-агентам против PNPLA3, включая лиганд (NAG37)s). Каждый из РНКи-агентов против PNPLA3, J1D00008 (группа 2), J1D00046 (группа 3), J1D00047 (группа 4) и J1D00048 (группа 5), включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 2180 гена; РНКи-агенты против PNPLA3, J1D00011 (группа 6), J1D00043 (группа 7), J1D00044 (группа 8) и J1D00045 (группа 9), включает нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 1179 гена; РНКи-агент против PNPLA3 J1D00020 (группа 10) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 544 гена; и РНКи-агент против PNPLA3 J1D00026 (группа 11) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 1195 гена. (См., например, SEO ID NO:1 и таблицу 2 для указанного гена PNPLA3).

5

10

15

20

[0257] Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т. е. инъекции были подкожными) в вялую кожу в области шеи и плеч. Исследовали по 4 (четыре) мыши в каждой группе (n = 4). Сыворотку собирали в день -1 (перед лечением), день 8, день 15, день 22 и день 29 и определяли уровни экспрессии SEAP в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Данные эксперимента показаны в следующих таблицах 17 и 18.

Таблица 17. Средняя экспрессия SEAP, нормализованная к уровню до лечения (день -1) у мышей с усеченным транскриптом PNPLA3-SEAP из примера 6

	Де	День 8		њ 15	Ден	ь 22	День 29	
ИД группы	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)
Группа 1 (несущая среда — физраствор)	1,434	0,237	1,189	0,385	0,616	0,022	1,323	0,693
Группа 2 (3,0 мг/кг J1D00008)	0,328	0,215	0,356	0,186	0,329	0,129	1,342	0,529
Группа 3 (3,0 мг/кг J1D00046)	0,254	0,240	0,356	0,478	0,303	0,338	0,370	0,210
Группа 4 (3,0 мг/кг J1D00047)	0,219	0,080	0,127	0,042	0,106	0,017	0,488	0,072
Группа 5 (3,0 мг/кг J1D00048)	0,153	0,055	0,158	0,064	0,175	0,078	0,463	0,126
Группа 6 (3,0 мг/кг J1D00011)	0,782	0,468	0,874	0,597	0,461	0,361	0,714	0,582
Группа 7 (3,0 мг/кг J1D00043)	0,713	0,539	0,981	0,784	0,939	0,725	1,364	0,975
Группа 8 (3,0 мг/кг J1D00044)	0,683	0,113	0,539	0,143	0,355	0,096	0,891	0,217
Группа 9 (3,0 мг/кг J1D00045)	0,479	0,309	0,547	0,101	0,383	0,201	0,935	0,361
Группа 10 (3,0 мг/кг J1D00020)	0,726	0,575	0,906	0,856	0,506	0,376	1,255	1,244
Группа 11 (3,0 мг/кг J1D00026)	0,590	0,431	0,395	0,434	0,351	0,322	0,703	0,293

^{*} Как отмечено выше в примере 2, постепенное снижение SEAP в группе контроля — несущей среды (группа 1) с течением времени связано с потерей репортерного гена SEAP в клетках мышей вследствие естественной репликации клеток у животных и не является результатом влияния какого-либо ингибирующего соединения.

Таблица 18. Средняя экспрессия SEAP, нормализованная к уровню до лечения (день -1) и контролю — несущей среде у мышей с усеченным транскриптом PNPLA3-SEAP из примера 6

	День 8		День 15		День 22		День 29	
ИД группы	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)						
Группа 1 (несущая среда — физраствор)	1,000	0,165	1,000	0,323	1,000	0,035	1,000	0,524
Группа 2 (3,0 мг/кг J1D00008)	0,229	0,150	0,299	0,156	0,535	0,209	1,014	0,400
Группа 3 (3,0 мг/кг J1D00046)	0,177	0,167	0,299	0,402	0,492	0,549	0,280	0,159
Группа 4 (3,0 мг/кг J1D00047)	0,153	0,056	0,107	0,035	0,173	0,028	0,369	0,055
Группа 5 (3,0 мг/кг J1D00048)	0,107	0,038	0,133	0,054	0,283	0,127	0,350	0,095
Группа 6 (3,0 мг/кг J1D00011)	0,545	0,326	0,735	0,502	0,749	0,586	0,540	0,440
Группа 7 (3,0 мг/кг J1D00043)	0,497	0,375	0,825	0,660	1,524	1,177	1,031	0,737
Группа 8 (3,0 мг/кг J1D00044)	0,476	0,079	0,453	0,120	0,576	0,157	0,674	0,164
Группа 9 (3,0 мг/кг J1D00045)	0,334	0,215	0,460	0,085	0,621	0,327	0,706	0,272
Группа 10 (3,0 мг/кг J1D00020)	0,506	0,401	0,762	0,720	0,822	0,611	0,949	0,940
Группа 11 (3,0 мг/кг J1D00026)	0,411	0,300	0,333	0,365	0,569	0,523	0,531	0,222

Пример 7. Тестирование РНКи-агентов против PNPLA3 in vivo на мышах PNPLA3-SEAP

[0258] Использовали мышиную модель PNPLA3-SEAP, как описано в примере 2 выше, с применением плазмиды, содержащей усеченную версию транскрипта PNPLA3 человека. В день 1 каждой мыши однократно подкожно вводили раствор, содержащий либо 1,5 мг/кг (mpk) PHКи-агента против PNPLA3, приготовленного в физрастворе, либо контроль — несущую среду (физраствор без PHКи-агента), в дозе 200 мкл/20 г массы тела животного в соответствии со следующей таблицей 19.

Таблица 19. Целевые положения и группы введения из примера 7

5

10

15

Группа	Целевая позиция в гене (в SEQ ID NO: 1)	РНКи-агент и доза	Режим дозирования
1	Н/П	Физраствор (без РНКи- агента)	Одиночная инъекция в день 1
2	2180	1,5 мг/кг Ј1D00008	Одиночная инъекция в день 1
3	538	1,5 мг/кг Ј1D00018	Одиночная инъекция в день 1
4	538	1,5 мг/кг Ј1D00019	Одиночная инъекция в день 1
5	687	1,5 мг/кг Ј1D00013	Одиночная инъекция в день 1
6	751	1,5 мг/кг Ј1D00006	Одиночная инъекция в день 1
7	751	1,5 мг/кг Ј1D00007	Одиночная инъекция в день 1
8	1181	1,5 мг/кг Ј1D00035	Одиночная инъекция в день 1
9	685	1,5 мг/кг Ј1D00033	Одиночная инъекция в день 1
10	373	1,5 мг/кг Ј1D00032	Одиночная инъекция в день 1
11	1837	1,5 мг/кг Ј1D00040	Одиночная инъекция в день 1

[0259] Каждый из РНКи-агентов против PNPLA3 включал модифицированные нуклеотиды, которые были конъюгированы на 5'-конце смысловой нити с нацеливающим лигандом, который включал три группы N-ацетилгалактозамина (трехзубчатый лиганд), включая модифицированные последовательности, обозначенные в дуплексных структурах в настоящем документе. (См. таблицы 3–5, где представлены конкретные модификации и информация о структуре, относящиеся к РНКи-агентам против PNPLA3, включая лиганд (NAG37)s). РНКи-агент против PNPLA3 J1D00008 (группа 2) включал нуклеотидные последовательности, которые

были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 2180 гена; РНКи-агенты против PNPLA3 J1D000018 (группа 3) и J1D00019 (группа 4) включали нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 538 гена; РНКи-агент против PNPLA3 J1D00013 (группа 5) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 687 гена; РНКи-агенты против PNPLA3 J1D000006 (группа 6) и J1D00007 (группа 7) включали нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 751 гена; РНКи-агент против PNPLA3 J1D00035 (группа 8) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 1181 гена; РНКи-агент против PNPLA3 J1D00033 (группа 9) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 685 гена; РНКи-агент против PNPLA3 J1D00032 (группа 10) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 373 гена; и РНКи-агент против PNPLA3 J1D00040 (группа 11) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 1837 гена. (См., например, SEQ ID NO:1 и таблицу 2 для указанного гена PNPLA3).

5

10

15

[0260] Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т. е. инъекции были подкожными) в вялую кожу в области шеи и плеч. Исследовали по 4 (четыре) мыши в каждой группе (n = 4). Сыворотку собирали в день -1 (перед лечением), день 8, день 15, день 22 и день 29 и определяли уровни экспрессии SEAP в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Данные эксперимента показаны в следующих таблицах 20 и 21.

Таблица 20. Средняя экспрессия SEAP, нормализованная к уровню до лечения (день -1) у мышей с усеченным транскриптом PNPLA3-SEAP из примера 7

	День 8		День 15		День 22		День 29	
ИД группы	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)						
Группа 1 (несущая среда — физраствор)	0,302	0,188	0,192	0,105	0,209	0,194	0,167	0,145
Группа 2 (1,5 мг/кг J1D00008)	0,083	0,035	0,113	0,105	0,127	0,105	0,148	0,119
Группа 3 (1,5 мг/кг J1D00018)	0,505	0,344	0,561	0,425	0,455	0,295	0,424	0,283
Группа 4 (1,5 мг/кг J1D00019)	0,293	0,152	0,329	0,169	0,337	0,215	0,291	0,203
Группа 5 (1,5 мг/кг J1D00013)	0,101	0,099	0,084	0,065	0,076	0,061	0,110	0,115
Группа 6 (1,5 мг/кг J1D00006)	0,221	0,140	0,265	0,265	0,218	0,232	0,126	0,191
Группа 7 (1,5 мг/кг J1D00007)	0,257	0,102	0,237	0,172	0,162	0,082	0,177	0,088
Группа 8 (1,5 мг/кг J1D00035)	0,548	0,504	0,344	0,278	0,406	0,361	0,413	0,395
Группа 9 (1,5 мг/кг J1D00033)	0,481	0,154	0,270	0,126	0,204	0,114	0,258	0,115
Группа 10 (1,5 мг/кг J1D00032)	0,687	0,145	0,831	0,243	0,639	0,270	0,464	0,093
Группа 11 (1,5 мг/кг J1D00040)	0,237	0,101	0,190	0,085	0,182	0,100	0,162	0,137

^{*} Как отмечено выше в примере 2, постепенное снижение SEAP в группе контроля — несущей среды (группа 1) с течением времени связано с потерей репортерного гена SEAP в клетках мышей вследствие естественной репликации клеток у животных и не является результатом влияния какого-либо ингибирующего соединения.

Таблица 21. Средняя экспрессия SEAP, нормализованная к уровню до лечения (день -1) и контролю — несущей среде у мышей с усеченным транскриптом PNPLA3-SEAP из примера 7

	День 8		День 15		День 22		День 29	
ИД группы	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)						
Группа 1 (несущая среда — физраствор)	1,000	0,621	1,000	0,549	1,000	0,927	1,000	0,868
Группа 2 (1,5 мг/кг J1D00008)	0,275	0,117	0,588	0,547	0,606	0,503	0,887	0,710
Группа 3 (1,5 мг/кг J1D00018)	1,673	1,139	2,924	2,217	2,175	1,408	2,536	1,691
Группа 4 (1,5 мг/кг J1D00019)	0,969	0,502	1,713	0,879	1,611	1,028	1,737	1,214
Группа 5 (1,5 мг/кг J1D00013)	0,335	0,327	0,440	0,341	0,364	0,293	0,657	0,686
Группа 6 (1,5 мг/кг J1D00006)	0,730	0,462	1,383	1,379	1,043	1,108	0,753	1,144
Группа 7 (1,5 мг/кг J1D00007)	0,850	0,339	1,234	0,894	0,772	0,393	1,057	0,527
Группа 8 (1,5 мг/кг J1D00035)	1,814	1,669	1,794	1,451	1,939	1,724	2,471	2,365
Группа 9 (1,5 мг/кг J1D00033)	1,592	0,509	1,409	0,658	0,974	0,545	1,541	0,685
Группа 10 (1,5 мг/кг J1D00032)	2,274	0,479	4,330	1,265	3,050	1,292	2,772	0,559
Группа 11 (1,5 мг/кг J1D00040)	0,784	0,335	0,991	0,445	0,870	0,476	0,967	0,817

Пример 8. Тестирование РНКи-агентов против PNPLA3 in vivo на мышах PNPLA3-SEAP

[0261] Использовали мышиную модель PNPLA3-SEAP, как описано в примере 2 выше, с применением плазмиды, содержащей усеченную версию транскрипта PNPLA3 человека. В день 1 каждой мыши однократно подкожно вводили раствор, содержащий либо 1,5 мг/кг (mpk) PHKи-агента против PNPLA3, приготовленного в физрастворе, либо контроль — несущую среду (физраствор без PHKи-агента), в дозе 200 мкл/20 г массы тела животного в соответствии со следующей таблицей 22.

Таблица 22. Целевые положения и группы введения из примера 8

5

10

15

20

Группа	Целевая позиция в гене (в SEQ ID NO: 1)	РНКи-агент и доза	Режим дозирования
1	Н/П	Физраствор (без РНКи- агента)	Одиночная инъекция в день 1
2	2180	1,5 мг/кг Ј1D00008	Одиночная инъекция в день 1
3	2180	1,5 мг/кг Ј1D00074	Одиночная инъекция в день 1
4	2180	1,5 мг/кг Ј1D00075	Одиночная инъекция в день 1
5	2180	1,5 мг/кг Ј1D00076	Одиночная инъекция в день 1
6	2180	1,5 мг/кг Ј1D00077	Одиночная инъекция в день 1
7	2180	1,5 мг/кг Ј1D00078	Одиночная инъекция в день 1
8	2180	1,5 мг/кг Ј1D00048	Одиночная инъекция в день 1
9	2180	1,5 мг/кг Ј1D00079	Одиночная инъекция в день 1
10	2180	1,5 мг/кг Ј1D00080	Одиночная инъекция в день 1

Каждый из РНКи-агентов против PNPLA3 включал модифицированные [0262] которые были конъюгированы на 5'-конце смысловой нити с нуклеотиды, нацеливающим лигандом, который включал три группы N-ацетилгалактозамина (трехзубчатый модифицированные лиганд), включая последовательности, обозначенные в дуплексных структурах в настоящем документе. (См. таблицы 3-5, где представлены конкретные модификации и информация о структуре, относящиеся к РНКи-агентам против PNPLA3, включая лиганд (NAG37)s). РНКи-агенты против PNPLA3 каждой (группы 2–10) включали ИЗ групп нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 2180 гена. (См., например, SEQ ID NO:1 и таблицу 2 для указанного гена PNPLA3).

[0263] Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т. е. инъекции были подкожными) в вялую кожу в области шеи и плеч. Исследовали по 4 (четыре) мыши в каждой группе (n = 4). Сыворотку собирали в день -1 (перед лечением), день 8, день 15, день 22 и день 29 и определяли уровни экспрессии SEAP в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Данные эксперимента показаны в следующих таблицах 23 и 24.

Таблица 23. Средняя экспрессия SEAP, нормализованная к уровню до лечения (день -1) у мышей с усеченным транскриптом PNPLA3-SEAP из примера 8

	День 8		Де	нь 15	День 22		День 29	
ИД группы	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)						
Группа 1 (несущая среда — физраствор)	1,134	0,219	0,851	0,295	0,826	0,637	0,759	0,471
Группа 2 (1,5 мг/кг J1D00008)	0,367	0,080	0,267	0,138	0,374	0,202	0,410	0,309
Группа 3 (1,5 мг/кг J1D00074)	0,205	0,063	0,211	0,072	0,276	0,108	0,396	0,182
Группа 4 (1,5 мг/кг J1D00075)	0,705	0,202	0,673	0,370	0,634	0,415	0,571	0,427
Группа 5 (1,5 мг/кг J1D00076)	0,484	0,312	0,307	0,200	0,315	0,301	0,260	0,189
Группа 6 (1,5 мг/кг J1D00077)	0,445	0,293	0,290	0,186	0,400	0,329	0,310	0,207
Группа 7 (1,5 мг/кг J1D00078)	0,190	0,099	0,153	0,122	0,289	0,292	0,291	0,255
Группа 8 (1,5 мг/кг J1D00048)	0,341	0,194	0,389	0,306	0,345	0,089	0,418	0,232
Группа 9 (1,5 мг/кг J1D00079)	0,213	0,105	0,174	0,189	0,285	0,249	0,311	0,248
Группа 10 (1,5 мг/кг J1D00080)	0,270	0,143	0,277	0,159	0,439	0,309	0,525	0,411

^{*} Как отмечено выше в примере 2, постепенное снижение SEAP в группе контроля — несущей среды (группа 1) с течением времени связано с потерей репортерного гена SEAP в клетках мышей вследствие естественной репликации клеток у животных и не является результатом влияния какого-либо ингибирующего соединения.

Таблица 24. Средняя экспрессия SEAP, нормализованная к уровню до лечения (день -1) и контролю — несущей среде у мышей с усеченным транскриптом PNPLA3-SEAP из примера 8

	День 8		День 15		День 22		День 29	
ИД группы	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)						
Группа 1 (несущая среда — физраствор)	1,000	0,193	1,000	0,347	1,000	0,771	1,000	0,620
Группа 2 (1,5 мг/кг J1D00008)	0,324	0,071	0,314	0,162	0,453	0,245	0,540	0,408
Группа 3 (1,5 мг/кг J1D00074)	0,181	0,056	0,248	0,085	0,334	0,131	0,522	0,240
Группа 4 (1,5 мг/кг J1D00075)	0,621	0,178	0,791	0,435	0,768	0,503	0,752	0,563
Группа 5 (1,5 мг/кг J1D00076)	0,426	0,275	0,361	0,235	0,382	0,365	0,343	0,250
Группа 6 (1,5 мг/кг J1D00077)	0,393	0,258	0,341	0,219	0,484	0,398	0,409	0,273
Группа 7 (1,5 мг/кг J1D00078)	0,168	0,087	0,180	0,144	0,350	0,353	0,384	0,337
Группа 8 (1,5 мг/кг J1D00048)	0,300	0,171	0,457	0,359	0,418	0,108	0,551	0,306
Группа 9 (1,5 мг/кг J1D00079)	0,188	0,093	0,204	0,222	0,345	0,301	0,410	0,327
Группа 10 (1,5 мг/кг J1D00080)	0,238	0,126	0,326	0,187	0,531	0,374	0,692	0,542

Каждый из РНКи-агентов против PNPLA3 в каждой из групп введения (т. е. группы 2–10) показал снижение экспрессии SEAP по сравнению с контролем, получавшим контроль — несущую среду (группа 1), во всех измеренных временных точках.

5 Пример 9. Тестирование РНКи-агентов против PNPLA3 in vivo на мышах PNPLA3-SEAP

[0264] Использовали мышиную модель PNPLA3-SEAP, как описано в примере 2 выше, с применением плазмиды, содержащей усеченную версию транскрипта PNPLA3 человека. В день 1 каждой мыши однократно подкожно вводили раствор, содержащий 1,5 мг/кг (mpk) PHКи-агента против PNPLA3, приготовленного в физрастворе, или контроль — несущую среду (физраствор без PHКи-агента), в дозе 200 мкл/20 г массы тела животного, и сюда относились группы введения в соответствии со следующей таблицей 25.

Таблица 25. Целевые положения и группы введения из примера 9

10

15

20

Группа	Целевая позиция в гене (в SEQ ID NO: 1)	РНКи-агент и доза	Режим дозирования
1	Н/П	Физраствор (без РНКи- агента)	Одиночная инъекция в день 1
2	2180	1,5 мг/кг Ј1D00008	Одиночная инъекция в день 1
3	887	1,5 мг/кг Ј1D00081	Одиночная инъекция в день 1
4	1185	1,5 мг/кг Ј1D00083	Одиночная инъекция в день 1
5	1191	1,5 мг/кг Ј1D00084	Одиночная инъекция в день 1
6	1191	1,5 мг/кг Ј1D00085	Одиночная инъекция в день 1
7	1746	1,5 мг/кг Ј1D00087	Одиночная инъекция в день 1
8	1173	1,5 мг/кг Ј1D00082	Одиночная инъекция в день 1

[0265] Каждый из РНКи-агентов против PNPLA3 включал модифицированные нуклеотиды, которые были конъюгированы на 5'-конце смысловой нити с нацеливающим лигандом, который включал три группы N-ацетилгалактозамина (трехзубчатый лиганд), включая модифицированные последовательности, обозначенные в дуплексных структурах в настоящем документе. (См. таблицы 3–5, где представлены конкретные модификации и информация о структуре, относящиеся к РНКи-агентам против PNPLA3, включая лиганд (NAG37)s). РНКи-агент против

PNPLA3 J1D00008 (группа 2) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 2180 гена; РНКи-агент против PNPLA3 J1D00081 (группа 3) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 887 гена; РНКи-агент против PNPLA3 J1D00083 (группа 4) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 1185 гена; Каждый из РНКиагентов против PNPLA3, J1D00084 (группа 5) и J1D00085 (группа 6), включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 1191 гена; РНКи-агент против PNPLA3 J1D00087 (группа 7) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 1746 гена; и РНКи-агент против PNPLA3 J1D00082 (группа 8) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 1173 гена. (См., например, SEQ ID NO:1 и таблицу 2 для указанного гена PNPLA3).

5

10

15

20

[0266] Инъекции выполняли между кожей и мышцами (т. е. инъекции были подкожными) в вялую кожу в области шеи и плеч. Исследовали по 4 (четыре) мыши в каждой группе (n = 4). Сыворотку собирали в день -1 (перед лечением), день 8, день 15, день 22 и день 29 и определяли уровни экспрессии SEAP в соответствии с процедурой, приведенной выше в примере 2. Данные эксперимента показаны в следующих таблицах 26 и 27.

Таблица 26. Средняя экспрессия SEAP, нормализованная к уровню до лечения (день -1) у мышей с усеченным транскриптом PNPLA3-SEAP из примера 9

	День 8		День 15		День 22		День 29	
ИД группы	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)						
Группа 1 (несущая среда — физраствор)	0,668	0,265	0,578	0,386	0,522	0,289	1,227	1,269
Группа 2 (1,5 мг/кг J1D00008)	0,236	0,177	0,149	0,116	0,448	0,343	0,822	0,725
Группа 3 (1,5 мг/кг J1D00081)	0,339	0,160	0,254	0,179	0,320	0,192	0,529	0,330
Группа 4 (1,5 мг/кг J1D00083)	0,524	0,404	0,332	0,304	0,375	0,227	0,564	0,517
Группа 5 (1,5 мг/кг J1D00084)	0,304	0,200	0,158	0,142	0,185	0,167	0,343	0,364
Группа 6 (1,5 мг/кг J1D00085)	0,506	0,241	0,320	0,241	0,355	0,220	0,718	0,497
Группа 7 (1,5 мг/кг J1D00087)	0,170	0,069	0,122	0,092	0,252	0,102	0,549	0,028
Группа 8 (1,5 мг/кг J1D00082)	0,508	0,302	0,454	0,308	0,488	0,361	0,914	0,661

^{*} Как отмечено выше в примере 2, постепенное снижение SEAP в группе контроля — несущей среды (группа 1) с течением времени связано с потерей репортерного гена SEAP в клетках мышей вследствие естественной репликации клеток у животных и не является результатом влияния какого-либо ингибирующего соединения.

Таблица 27. Средняя экспрессия SEAP, нормализованная к уровню до лечения (день -1) и контролю — несущей среде у мышей с усеченным транскриптом PNPLA3-SEAP из примера 9

	День 8		День 15		День 22		День 29	
ИД группы	Средн. SEAP	Станд. откл. (+/-)						
Группа 1 (несущая среда — физраствор)	1,000	0,397	1,000	0,668	1,000	0,553	1,000	1,034
Группа 2 (1,5 мг/кг J1D00008)	0,353	0,265	0,259	0,201	0,860	0,658	0,669	0,591
Группа 3 (1,5 мг/кг J1D00081)	0,507	0,240	0,440	0,310	0,613	0,369	0,431	0,269
Группа 4 (1,5 мг/кг J1D00083)	0,784	0,604	0,574	0,526	0,719	0,435	0,459	0,421
Группа 5 (1,5 мг/кг J1D00084)	0,455	0,300	0,273	0,246	0,355	0,320	0,279	0,297
Группа 6 (1,5 мг/кг J1D00085)	0,757	0,360	0,555	0,418	0,681	0,421	0,585	0,405
Группа 7 (1,5 мг/кг J1D00087)	0,255	0,103	0,211	0,160	0,483	0,195	0,448	0,022
Группа 8 (1,5 мг/кг J1D00082)	0,759	0,452	0,786	0,534	0,935	0,693	0,745	0,539

Пример 10. Тестирование РНКи-агентов против PNPLA3 in vivo на яванских макаках

[0267] РНКи-агенты против PNPLA3 J1D00003, J1D00008 и J1D00017 протестировали на яванских макаках (cynos). В дни 1 и 43 четырем яванским макакам в каждой группе (n = 4) вводили подкожную инъекцию 0,4 мл/кг (объем приблизительно 1,5 мл, в зависимости от массы животного), содержащую 4,0 мг/кг (10 мг/мл) соответствующего РНКи-агента против PNPLA3, приготовленного в носителефизрастворе, или только физраствор, без РНКи-агента, в качестве контроля (см. таблицу 28 ниже).

Таблица 28. Целевые положения и группы введения из примера 10

5

10

15

20

25

Группа	Целевая позиция в гене	РНКи-агент и доза	Режим дозирования (в день 1
	(B SEQ ID NO: 1)		и 43)
1	Н/П	Физраствор (без РНКи-	Однократная подкожная
		агента)	инъекция
2	1586	4,0 мг/кг Ј1D00003	Однократная подкожная
			инъекция
3	2180	4,0 мг/кг Ј1D00008	Однократная подкожная
			инъекция
4	1179	4,0 мг/кг Ј1D00017	Однократная подкожная
			инъекция

[0268] РНКи-агенты против PNPLA3 включали модифицированные нуклеотиды и трехзубчатый N-ацетилгалактозамин-содержащий нацеливающий лиганд ((NAG37)s), конъюгированный с 5'-концом смысловой нити, как показано в таблицах 3–6. РНКи-агент против PNPLA3 J1D00003 (группа 2) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 1586 гена; РНКи-агент против PNPLA3 J1D00008 (группа 3) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 2180 гена; и РНКи-агент против PNPLA3 J1D00017 (группа 4) включал нуклеотидные последовательности, которые были разработаны для ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в положении 1179 гена.

[0269] В дни -13 (до введения дозы), 15, 29, 57 и 76 брали образцы биопсии печени. В день каждого взятия образца биопсии яванских макак анестезировали и с помощью лапароскопии брали два образца ткани печени приблизительно от 80 мг до 120 мг каждый. Образцы биопсии затем гомогенизировали и уровни мРНК PNPLA3 в печени яванского макака измеряли методом кПЦР с обратной транскрипцией ОТ-кПЦР.

Полученные значения затем нормализовали к уровню мРНК PNPLA3 до введения (в данном случае к дню -13). Полученные данные мРНК представлены в следующей таблице 29.

5 **Таблица 29.** Уровни мРНК PNPLA3, нормализованные к уровню до введения (день - 13) из примера 10 для каждой группы (n = 4)

	День 15		День 29			
	Относительная	Нижний	Верхний	Относительная	Нижний	Верхний
	экспрессия	уровень	уровень	экспрессия	уровень	уровень
	MPHK PNPLA3	ошибки	ошибки	мРНК PNPLA3	ошибки	ошибки
Группа 1.	0,768	0,144	0,178	0,616	0,138	0,178
Физраствор						
Группа 2. J1D00003	0,624	0,222	0,345	0,468	0,178	0,287
Группа 3. J1D00008	0,486	0,065	0,074	0,455	0,120	0,164
Группа 4. Ј1D00017	0,671	0,211	0,307	0,517	0,088	0,105
	День 57		День 76			
	Относительная	Нижний	Верхний	Относительная	Нижний	Верхний
	экспрессия	уровень	уровень	экспрессия	уровень	уровень
	MPHK PNPLA3	ошибки	ошибки	MPHK PNPLA3	ошибки	ошибки
Группа 1.	1,037	0,313	0,448	0,569	0,121	0,153
Физраствор						
Группа 2. J1D00003	0,449	0,176	0,290	0,649	0,321	0,636
Группа 3. J1D00008	0,526	0,062	0,070	0,631	0,085	0,099
Группа 4. J1D00017	0,795	0,217	0,298	0,824	0,221	0,301

Пример 11. Тестирование РНКи-агента против PNPLA3 J1D00008 in vivo на яванских макаках

[0270] Целью этого исследования была оценка РНКи-агента J1D00008 как по глубине, так и по продолжительности нокдауна мРНК PNPLA3 дикого типа (WT) в печени яванских макак. Нокдаун нормировали для каждого животного к исходным показателям, полученным из биоптатов печени, взятых до введения.

[0271] Материалы и способы

10

15

20

[0272] Исследование 1. Макак группировали по массе тела (2–5 кг) в группу, получавшую физраствор (группа 1), или группу, получавшую РНК (группы 2–4), n = 4 на группу. Макакам выполняли два введения в дни 1 и 43 подкожно в дозе 4 мг/кг в 0,4 мл/кг физраствора. Перед биопсией и забором крови яванские макаки голодали в течение ночи, по меньшей мере 12 часов. Образцы биопсии печени отбирали у всех животных до введения и в дни тестирования: в день 15, 29, 57 и 76. Для каждого животного собирали образцы биопсии печени (2х, приблизительно по 100 мг каждый) для количественного определения мРНК PNPLA3 методом количественной ПЦР (кПЦР) и *in situ* гибридизации (ISH). Кровь собирали из бедренной вены каждого

животного до введения и после введения, в дни 15, 29, 57 и 76. Для всех животных, групп и временных точек РНК выделяли из левой боковой доли печени для выполнения кОТ-ПЦР, данные нормировали к конститутивному гену (ARFGAP2) и относительную экспрессию сравнивали с исходными/взятыми до введения биоптатами. В конце исследования измеряли экспрессию PNPLA3 в левой и правой боковых и медианной долях печени из групп 1 и 3 для подтверждения того, что экспрессия не менялась в зависимости от доли и что левая боковая доля была репрезентативной. Выполняли анализ биоптатов яванских макак методом гибридизации *in situ* на основе анализа RNAscope® (ACDbio, Newark, CA). Для количественного определения количества копий мРНК PNPLA3 в данных популяциях клеток печени использовали количественный программный анализ изображений (программное обеспечение НАLO^{тм}, производство Indica Labs, Albuquerque, NM).

[0273] Исследование 2. Второе исследование на приматах, не являющихся человеком, проводили, как описано в исследовании 1, со следующими модификациями или дополнениями. Макак группировали по массе тела (2-5 кг) на две группы, получавшие РНКи, n = 10 на группу. Животным в дни 1 и 29 подкожно вводили дозу 4 мг/кг в физрастворе, а затем наблюдали в течение 57 дней.

[0274] Результаты

5

10

15

20

25

30

[0275] Полученные в исследовании 1 методом ПЦР данные об экспрессии PNPLA3 для PHКи-агента J1D00008 показаны на Фиг. 1. мPHK PNPLA3 снижалась на 51%, 55%, 47% и 37% в соответствующих временных точках с нормализацией к исходному уровню и конститутивному гену. После получения этих результатов выполняли гибридизацию *in situ* (ISH) для оценки внутриклеточного (цитоплазматического в сравнении с ядерным) распределения мPHK PNPLA3. Было отмечено, что приблизительно 50% мPHK PNPLA3 всей клетки находилось в ядре. Это указывает на то, что PHКи-агент J1D00008 значительно снижал мPHK PNPLA3 в местах трансляции белка (т. е. в цитоплазме гепатоцитов), но при этом нокдаун на уровне всей клетки недооценивался методом кПЦР из-за искажающего остаточного пула ядерной мPHK PNPLA3. Таким образом количественно определяли нокдаун цитоплазматической мPHK PNPLA3.

[0276] ISH-анализ, выполненный на биоптатах печени яванских макак, получавших РНКи-агент J1D00008, показал сохранение значительного количества остаточной мРНК PNPLA3 в ядре клеток, это подтверждает предположение, что этот пул искажал результаты по нокдауну в цельной печени, полученные методом кПЦР.

[0277] Количественное определение по изображениям ISH показало, что при обработке РНКи-агентом J1D00008 уровень мРНК PNPLA3 в цитоплазме был снижен на 44–63% в течение всех 76 дней (таблица 30). Поскольку GalNAc-PHKи-агенты, такие как PHKи-агент J1D00008, опосредуют деградацию мРНК-мишени специфически в цитоплазме гепатоцитов, количественное определение в цельной печени нокдауна PNPLA3 маскируется относительным вкладом мРНК PNPLA3 из нецелевых типов клеток (например, звездчатых клеток и купферовских клеток). Следовательно, проводили модельный анализ для оценки снижения мРНК PNPLA3 специфически в цитоплазме гепатоцитов, с коррекцией на внегепатоцитарную экспрессию мРНК PNPLA3. В таблице 31 перечислены соответствующие допущения для физиологии печени, используемые в моделировании.

5

10

15

20

[0278] Таблица 30. Количественная оценка по изображениям ISH для цельной цитоплазмы печени и ядерной экспрессии PNPLA3 относительно исходного уровня (день -13) в исследовании № 1

	(средн. кол-	Относитель- ная экспрессия	Относитель- ный нокдаун	(средн. кол-	шаа	Относитель- ный нокдаун
-13	0.52 ± 0.21	н/п	н/п	$0,62 \pm 0,27$	н/п	н/п
15	0.43 ± 0.15	0,84	0,16	0.20 ± 0.04	0,37	0,63
29	$0,40 \pm 0,13$	0,85	0,15	0.21 ± 0.05	0,38	0,62
57	0.53 ± 0.24	1,08	-0,08	$0,29 \pm 0,11$	0,50	0,50
76	0.70 ± 0.28	1,45	-0,45	0.33 ± 0.10	0,56	0,44

Данные представляют собой средние значения относительно исходного уровня \pm станд. откл. (N=4)

[0279] Таблица 31. Используемые в моделировании параметры, относящиеся к физиологии печени

Тип клеток	Состав печени (%	(o)
Гепатоциты	85	
Звездчатые клетки (HSC)	8	
Купферовские клетки (прочие)	7	
Тип клеток	Относительная	
тип клеток	экспрессия	мРНК

	PNPLA3
Гепатоциты	1x
Звездчатые клетки (HSC)	2x
Купферовские клетки (прочие)	1x

[0280] При использовании этой модели мРНК PNPLA3 была снижена на 81% в день 15 и на 78% в день 29 в цитоплазме гепатоцитов после одного п/к введения 4 мг/кг PHКи-агента J1D00008. При повторении этого моделирования в исследовании 2 достигали снижения экспрессии мРНК PNPLA3 на 66% и 65% в дни 15 и 29 соответственно. В среднем по всем исследуемым приматам, не являющимся человеком (NHP) (n = 14), при использовании PHКи-агента J1D00008 мРНК PNPLA3 была снижена на 70% в цитоплазме гепатоцитов в день 15 и в день 29 (ФИГ. 2).

Пример 12. Безопасность

[0281] Неклиническую безопасность введения РНКи-агента J1D00008 в течение 3 месяцев оценивали у крыс и обезьян в дозах до 500 мг/кг и 300 мг/кг соответственно. У обоих видов РНКи-агент J1D00008 хорошо переносился, и не наблюдали нежелательных признаков токсичности вплоть до самых высоких исследованных доз.

15

20

5

10

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0282] Следует понимать, что, хотя настоящее изобретение описано подробно, приводимое выше описание предназначено для иллюстрации и не ограничивает объем настоящего изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации входят в объем следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. РНКи-агент для ингибирования экспрессии гена, который содержит пататинподобный фосфолипазный домен белка 3 (PNPLA3), содержащий:

5

антисмысловую нить, содержащую по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, отличающихся 0 или 1 нуклеотидом от любой из последовательностей SEQ ID NO: 46-60, 176, 181 и 188; и

смысловую нить, содержащую нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере частично комплементарна антисмысловой нити.

10

2. РНКи-агент по п. 1, в котором антисмысловая нить содержит нуклеотиды 2–18 любой из последовательностей SEQ ID NO: 46-60, 176, 181 и 188.

15

3. РНКи-агент по п. 1 или п. 2, в котором смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность из по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, отличающихся 0 или 1 нуклеотидом от любой из последовательностей смысловой нити SEQ ID NO: 2, 3, 4, 9-20, 214, 219 и 220, и при этом смысловая нить имеет область из 17 смежных нуклеотидов с по меньшей мере 85% комплементарностью к антисмысловой нити.

20

4. РНКи-агент по любому из пп. 1-3, причем по меньшей мере один нуклеотид РНКи-агента представляет собой модифицированный нуклеотид или включает в себя модифицированную межнуклеозидную связь.

25

5. РНКи-агент по любому из пп. 1-3, причем все или по существу все нуклеотиды в смысловой и/или антисмысловой нити РНКи-агента представляют собой модифицированные нуклеотиды.

30

6. РНКи-агент по любому из п. 4–5, в котором модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из: 2'-О-метилнуклеотида, 2'-фторнуклеотида, 2'дезоксинуклеотида, 2',3'-секо-нуклеотидного миметика, блокированного нуклеотида, 2'-F-арабинонуклеотида, 2'-метоксиэтилнуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, рибита, инвертированного нуклеотида, инвертированного 2'-О-метилнуклеотида, инвертированного 2'-

дезоксинуклеотида, 2'-аминомодифицированного нуклеотида, 2'алкилмодифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, винилфосфонат-содержащего нуклеотида, циклопропилфосфонат-содержащего нуклеотида и 3'-О-метилнуклеотида.

5

7. РНКи-агент по п. 5, в котором все или по существу все модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метилнуклеотиды, 2'-фторнуклеотиды или их комбинации.

10

РНКи-агент по любому из пп. 1-7, в котором антисмысловая нить состоит из, по 8. существу состоит из или содержит нуклеотидную последовательность, представляющую собой любую из модифицированных последовательностей антисмысловой нити SEQ ID NO: 90, 95 и 102.

15

9. РНКи-агент по любому из пп. 1-8, в котором смысловая нить состоит из, по существу состоит из или содержит нуклеотидную последовательность любой из модифицированных последовательностей смысловой нити SEQ ID NO: 131, 136 и 137.

10. РНКи-агент по п. 1, в котором антисмысловая нить содержит нуклеотидную 20 последовательность, представляющую собой любую из модифицированных последовательностей SEQ ID NO: 90, 95 и 102, а смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представляющую собой любую из модифицированных последовательностей SEQ ID NO: 131, 136 и 137.

25

11. РНКи-агент по любому из пп. 1–10, который связан с нацеливающим лигандом.

12. РНКи-агент по п. 11, причем нацеливающий лиганд содержит Nацетилгалактозамин.

30

РНКи-агент по п. 11 или 12, причем нацеливающий лиганд имеет структуру (NAG37) или (NAG37)s.

- 14. РНКи-агент по любому из пп. 11–13, причем нацеливающий лиганд связан со смысловой нитью.
- 15. РНКи-агент по п. 14, причем нацеливающий лиганд связан с 5'-концом смысловой нити.
 - 16. РНКи-агент по любому из пп. 1–15, в котором смысловая нить имеет длину от 18 до 30 нуклеотидов и антисмысловая нить имеет длину от 18 до 30 нуклеотидов.
- 17. РНКи-агент по п. 16, в котором каждая из смысловой нити и антисмысловой нити имеет длину от 18 до 27 нуклеотидов.
 - 18. РНКи-агент по п. 17, в котором каждая из смысловой нити и антисмысловой нити имеет длину от 18 до 24 нуклеотидов.
 - 19. РНКи-агент по п. 18, в котором каждая из смысловой нити и антисмысловой нити имеет длину 21 нуклеотид.
 - 20. РНКи-агент по любому из пп. 16–19, имеющий два тупых конца.

15

20

- 21. РНКи-агент по любому из пп. 1–20, в котором смысловая нить содержит один или два концевых кэпа.
- 22. РНКи-агент по любому из пп. 1–22, в котором смысловая нить содержит один или
 два инвертированных лишенных азотистого основания остатка.
 - 23. РНКи-агент по п. 1, состоящий из смысловой нити и антисмысловой нити, которые образуют дуплексную последовательность SEQ ID NO: (176 и 214); (90 и 131); (181 и 219); (95 и 136); (188 и 220) и/или (102 и 137).
 - 24. РНКи-агент по любому из пп. 1–23, в котором смысловая нить дополнительно включает инвертированные лишенные азотистого основания остатки на 3'-конце нуклеотидной последовательности и/или на 5'-конце нуклеотидной последовательности.

25. РНКи-агент по п. 1, содержащий антисмысловую нить, которая содержит, состоит из или по существу состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности, которая отличается 0 или 1 нуклеотидом от одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 90, 95 и 102; причем а, с, g и и представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно; s представляет собой фосфоротиоатную связь; и при этом все или по существу все нуклеотиды смысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

5

10

15

20

- 26. РНКи-агент по п. 1, в котором смысловая нить содержит, состоит из или по существу состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности, которая отличается 0 или 1 нуклеотидом от одной из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 214, 219 и 256; причем а, с, g, i и и представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин, инозин и уридин соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно; в представляет собой фосфоротиоатную связь; и при этом все или по существу все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.
 - 27. РНКи-агент по любому из пп. 24–26, в котором смысловая нить дополнительно включает инвертированные лишенные азотистого основания остатки на 3'-конце нуклеотидной последовательности и/или на 5'-конце нуклеотидной последовательности.
 - 28. РНКи-агент по любому из пп. 24–27, причем смысловая нить РНКи-агента связана с нацеливающим лигандом.
- 29. РНКи-агент по п. 28, причем нацеливающий лиганд имеет аффинность к рецептору асиалогликопротеинов.
 - 30. РНКи-агент по п. 29, причем нацеливающий лиганд содержит N-ацетилгалактозамин.

31. РНКи-агент по п. 1, причем нацеливающий лиганд содержит:

32. РНКи-агент по п. 1, в котором антисмысловая нить состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 90, 95 и 102, а смысловая нить

состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 131, 136 и 137;

причем а, с, g и и представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно; s представляет собой фосфоротиоатную связь; (invAb) представляет собой инвертированный лишенный азотистого основания остаток дезоксирибозы; и (NAG37)s имеет следующую химическую структуру:

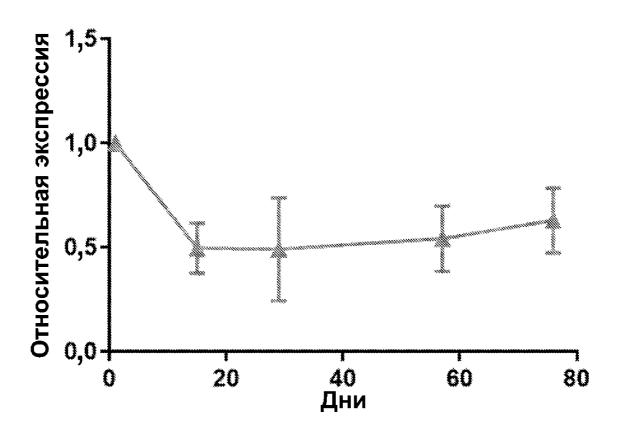
5

- 33. Композиция, содержащая РНКи-агент по любому из пп. 1–32, причем композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый эксципиент.
- 34. Способ ингибирования экспрессии гена PNPLA3 в клетке, включающий введение в клетку эффективного количества PHKи-агента по любому из пп. 1–32 или композиции по п. 33.
 - 35. Способ по п. 34, в котором клетка находится в теле субъекта.
- 20 36. Способ по п. 35, в котором субъект представляет собой человеческого индивида.

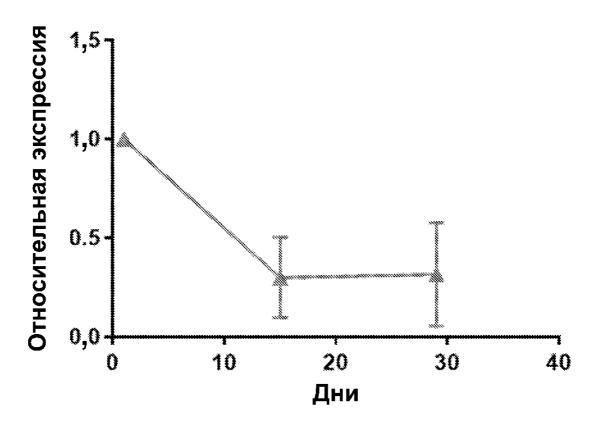
- 37. Способ по любому из пп. 34–36, в котором экспрессию гена PNPLA3 ингибируют на по меньшей мере около 30%.
- 38. Способ лечения заболевания или расстройства, связанного с PNPLA3,
 включающий введение нуждающемуся в этом человеческому индивиду терапевтически эффективного количества композиции по п. 33.

10

- 39. Способ по п. 38, причем заболевание представляет собой неалкогольную жировую дистрофию печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), фиброз печени, алкогольную жировую дистрофию печени или цирроз печени.
- 40. Способ по любому из пп. 34–39, в котором РНКи-агент вводят в дозе от около 0,05 мг/кг до около 5,0 мг/кг массы тела человеческого индивида.
- 15 41. Способ по любому из пп. 34–40, в котором РНКи-агент вводят двумя или более дозами.
 - 42. Применение РНКи-агента по любому из пп. 1–32 или композиции по п. 33 для лечения заболевания, расстройства или симптома, по меньшей мере частично опосредованного экспрессией гена PNPLA3.
 - 43. Применение по п. 42, причем симптом представляет собой цирроз печени.
- 44. Применение РНКи-агента по любому из пп. 1–32 или композиции по п. 33 для
 25 приготовления фармацевтических композиций для лечения заболевания,
 расстройства или симптома, по меньшей мере частично опосредованного экспрессией гена PNPLA3.
- 45. Применение по любому из пп. 42–44, причем заболевание представляет собой NAFLD, NASH, фиброз печени или алкогольное или неалкогольное заболевание печени, такое как цирроз печени.
 - 46. Применение по любому из пп. 42–45, причем РНКи-агент вводят в дозе от около 0,05 мг/кг до около 5,0 мг/кг массы тела человеческого индивида.



ФИГ. 1



ФИГ. 2