

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045013**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.10.26**

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

(21) Номер заявки  
**201792444**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.05.05**

**(54) КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ IRNA ДЛЯ ФАКТОРА XII (ФАКТОРА ХАГЕМАНА) (F12), ПЛАЗМЕННОГО КАЛЛИКРЕИНА В (ФАКТОРА ФЛЕТЧЕРА) 1 (KLKB1) И КИНИНОГЕНА 1 (KNG1) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/157,890; 62/260,887; 62/266,958**

(32) **2015.05.06; 2015.11.30; 2015.12.14**

(33) **US**

(43) **2018.06.29**

(86) **PCT/US2016/030876**

(87) **WO 2016/179342 2016.11.10**

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

(72) Изобретатель:  
**Акинк Акин, Хинкл Грегори,  
Майер Мартин, Батлер Джеймс, Лю  
Дзингсюань (US)**

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

(56) DATABASE WPI, Week 201272,  
Thomson Scientific, London, GB; AN 2012-N56669,  
XP002759432, & CN 102 600 471 A (ACAD  
MILITARY MEDICAL SCI CPLA INST MICR), 25  
July 2012 (2012-07-25), abstract

WO-A1-2009053050

WO-A1-2007059966

WO-A2-2007130604

J. BJÖRKQVIST ET AL.: "In vivo activation  
and functions of the protease factor XII",

THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 112, no.  
5, 4 September 2014 (2014-09-04), pages 868-875,  
XP055284513, DE, ISSN: 0340-6245, DOI: 10.1160/  
TH14-04-0311

ELLINOR KENNE ET AL.: "Factor XII: a  
drug target for safe interference with thrombosis and  
inflammation", DRUG DISCOVERY TODAY., vol.  
19, no. 9, 1 September 2014 (2014-09-01), pages  
1459-1464, XP055284501, US, ISSN: 1359-6446,  
DOI:10.1016/j.drudis.2014.06.024

DATABASE EMBL [Online], 18 April  
2011 (2011-04-18), "WO 2005116204-A/143347:  
Double strand polynucleotides generating RNA  
interference.", XP002759433, retrieved from EBI  
accession no. EMBL:FW736821, Database accession  
no. FW736821 sequence 143347 & WO 2005/116204  
A1 (RNAI CO LTD [JP]; NAITO YUKI [JP]; FUJINO  
MASATO [JP]; OGUCHI SHINOBU), 8 December  
2005 (2005-12-08) & EP 1 752 536 A1 (RNAI CO LTD  
[JP]), 14 February 2007 (2007-02-14)  
US-A1-2011178283

CAI TIAN-QUAN ET AL.: "Factor XII full  
and partial null in rat confers robust antithrombotic  
efficacy with no bleeding", BLOOD COAGULATION  
& FIBRINOLYSIS, LIPPINCOTT WILLIAMS &  
WILKINS, US, vol. 26, no. 8, 1 December 2015  
(2015-12-01), pages 893-902, XP008180738, ISSN:  
0957-5235, DOI:10.1097/MBC.0000000000000337,  
the whole document

(57) Изобретение относится к средствам для RNAi, например к двухнитевым средствам для RNAi, целенаправленно воздействующим на ген плазменного калликреина В (фактора Флетчера) 1 (KLKB1), ген фактора XII (фактора Хагемана (F12) или ген кининогена 1 (KNG1), и к способам применения таких средств для RNAi для ингибирования экспрессии гена KLKB1, гена F12 и/или гена KNG1, и к способам лечения субъектов с наследственным ангионевротическим отеком (HAE) и/или нарушением, ассоциированным с контактным путем активации свертывания крови.

**B1****045013****045013 B1**

### Родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки на выдачу патента США № 62/157890, поданной 6 мая 2015 года, предварительной заявки на выдачу патента США № 62/260887, поданной 30 ноября 2015 года, и предварительной заявки на выдачу патента США № 62/266958, поданной 14 декабря 2015 года. Полное содержание каждой из вышеупомянутых заявок тем самым включено в данный документ посредством ссылки.

### Перечень последовательностей

Настоящая заявка включает перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Указанная ASCII-копия, созданная 3 мая 2016 года, имеет название 121301-03120\_SL.txt, и ее размер составляет 721827 байт.

### Уровень техники

Система свертывания крови является необходимой для гемостаза, проявляя при этом реакцию на повреждение сосуда в виде локального образования сгустка, образованного сетью фибрина и активированными тромбоцитами. Свертывание крови, продуцирование тромбина и образование фибрина могут инициироваться двумя различными путями, называемыми внешним и внутренним путями.

Внешний путь включает связывание плазменного фактора VIIa (FVIIa) с внесосудистым тканевым фактором (TF) в участке повреждения сосуда.

Внутренний путь инициируется за счет зависимой от контакта с поверхностью активации плазменного фактора XII (F12) с F12a в процессе, называемом контактной активацией. В контактную активацию вовлечены два других белка, прекалликреин и высокомолекулярный кининоген, которые циркулируют в виде бимолекулярного комплекса. В совокупности эти три белка, FXII, прекалликреин и НК, образуют "путь контактной активации свертывания крови", также называемый "калликреин-кининовой системой". Когда путь контактной активации свертывания крови инициируется связыванием F12 с отрицательно заряженными поверхностями (или макромолекулами), происходит индуцирование конформационного изменения F12, что приводит к образованию активного F12 (F12a). F12a расщепляет прекалликреин с образованием активного калликреина ( $\alpha$ -калликреина), который в свою очередь реципрокно активирует F12 для продуцирования дополнительного F12a. Активный калликреин затем расщепляет высокомолекулярный кининоген с высвобождением брадикинина. F12a, образующийся в результате контактной активации, также активирует фактор XI (F11) с образованием F11a, при этом запускается ряд событий протеолитического расщепления, который завершается образованием тромбина и образованием фибринового сгустка.

Что интересно, было показано, что контактная система активации не является необходимой для гемостаза. У людей и других животных с дефицитом по белку, вовлеченному в контактную активацию, практически не проявляются симптомы, и у гомозигот дефицит по F12 не ассоциируется с каким-либо заболеванием или нарушением. Однако было показано, что контактная система активации играет важную роль в развитии тромботического заболевания, поскольку фармакологическое ингибирование F12a или деструкция генов F12 или высокомолекулярного кининогена могут защищать мышей от экспериментально индуцируемого тромбоза в различных моделях.

У здоровых субъектов имеет место гомеостатический баланс между прокоагуляционной активностью и антикоагуляционной и фибринолитической активностью. Однако многочисленные генетические, приобретенные факторы и факторы окружающей среды могут смещать регуляцию этого баланса в сторону свертывания крови, что приводит к тромбозу, патологическому образованию тромбов, инициации событий, представляющих угрозу для жизни. Например, образование тромбов в вене может приводить в результате, например, к тромбозу глубоких вен (DVT), а образование тромбов в артерии или камере сердца может приводить в результате, например, к инфаркту миокарда или инсульту. Тромбы могут затруднять кровоток и в участке образования или отрываться и приводить к эмболизации с последующей закупоркой дистального кровеносного сосуда (например, эмболия сосудов легких или эмболический инсульт).

Приобретенные факторы/факторы окружающей среды, которые могут приводить к патологической контактной активации и тромбозу, опосредованному контактным путем активации, включают различные вмешательства стоматологического, хирургического и медицинского характера, такие как фибрилляция предсердий, лечение рака, обездвиживание, наличие центрального венозного катетера, имплантатов и экстракорпоральная оксигенация. Вследствие таких медицинских и хирургических вмешательств в результате повреждения тканей высвобождаются тканевые факторы и обеспечивается воздействие различных триггеров контактного пути активации, таких как ДНК, РНК, фосфат, коллаген и ламинин), которые активируют контактный путь активации, приводящий к тромбозу.

Наследственное нарушение, при котором происходит нарушение регуляции гомеостатического баланса между прокоагуляционной активностью и антикоагуляционной и фибринолитической активностями, представляет собой наследственный ангионевротический отек (НАЕ). НАЕ представляет собой редкое нарушение с аутосомно-доминантным наследованием, которое является причиной рецидивирующего отека и опухания конечностей, лица, гортани, верхних дыхательных путей, живота, туловища и половых

органов и незудящей сыпи у одной трети пациентов. Пациенты с НАЕ, не получающие лечение, в среднем переносят от одного до двух приступов ангионевротического отека в месяц, но частота и тяжесть эпизодов может в значительной степени варьировать. Ангионевротический отек зачастую проявляется обезображиванием и потерей трудоспособности, что приводит в результате к частой госпитализации, а в некоторых случаях пациенты нуждаются в психиатрической помощи для лечения ассоциированной с заболеванием тревожности. Приступы в области брюшной полости могут вызывать сильную боль, тошноту и рвоту, а в некоторых случаях приводят к необходимости нештатных оперативных вмешательств. Кроме того, больше половины пациентов с НАЕ также на протяжении их жизни переносят опасный для жизни отек гортани, при котором может потребоваться неотложная трахеостомия для предупреждения асфиксии. Предположительно НАЕ поражено от 6000 до 10000 индивидуумов различных этнических групп в Соединенных Штатах, и он приводит к значительному материальному ущербу для пациентов, при этом он является причиной от 15000 до 30000 визитов в больницу и от 20 до 100 дней нетрудоспособности в год.

Причиной НАЕ является мутация в гене С1-ингибитора (С1INH, SERPING1), что приводит в результате к дефициту белка С1INH. Было показано, что свыше 250 различных мутаций С1INH обуславливают клинические проявления НАЕ. Эти мутации С1INH, как правило, наследуются генетически, однако до 25% случаев НАЕ являются результатом *de novo* мутаций С1INH. НАЕ I типа обусловлен мутациями С1INH, что приводит в результате к более низким уровням усеченных или неправильно уложенных белков, которые секретируются неэффективно, и составляет примерно 85% случаев НАЕ. НАЕ II типа составляет приблизительно 15% случаев, и он обусловлен мутациями вблизи активного сайта С1INH, что приводит к нормальным уровням неправильно функционирующего белка С1INH. В дополнение к этому НАЕ III типа, редкая третья форма заболевания, возникает вследствие мутации с приобретением функции фактора свертывания крови XII (F12) (фактора Хагемана).

С1-ингибитор представляет собой ингибитор сериновых протеаз из семейства серпинов и является основным ингибитором протеаз, вовлеченных в контактный путь активации свертывания крови и путь активации системы комплемента, а также минорным ингибитором фибринолитической протеазы плазмина. Эти протеолитические каскады активируются во время приступа НАЕ, опосредуя выработку веществ, которые повышают проницаемость сосудов, например брадикинина. Исследования показали, что пептид брадикинин, который активирует сигнальные пути провоспалительных реакций, которые опосредуют расширение сосудов и индуцируют хемотаксис нейтрофилов, является основным веществом, которое повышает проницаемость сосудов при приступе НАЕ посредством связывания с рецептором брадикинина на клетках эндотелия сосудов.

Как правило, С1INH ингибирует самоактивацию F12, способность F12a к активации прекалликреина, активацию высокомолекулярного кининогена с помощью калликреина и активацию F12 калликреином по типу обратной связи. Следовательно, мутации, обуславливающие дефицит С1INH или продуцирование F12 с приобретением функции, приводят в результате к избыточному продуцированию брадикинина и возникновению ангионевротического отека в форме НАЕ.

В настоящее время НАЕ можно лечить с помощью 17 $\alpha$ -алкилированных андрогенов в профилактических целях для снижения вероятности повторных эпизодов, или с помощью специфических в отношении заболевания терапевтических средств для лечения острых приступов. Приблизительно 70% индивидуумов с НАЕ лечат с помощью андрогенов или они вовсе остаются без лечения, а приблизительно 30% получают терапевтические средства. Андрогены не подходят для краткосрочного лечения острых приступов, поскольку требуется несколько дней, чтобы проявилась их эффективность, при этом они могут характеризоваться значительными побочными эффектами и могут негативно влиять на рост и развитие. Вследствие этого андрогены применяют только для долгосрочной профилактики и обычно их не вводят беременным женщинам или детям. Кроме того, существующие терапевтические средства, применяемые для лечения острых приступов, должны вводиться внутривенно много раз в неделю, или они могут вызывать побочные эффекты, в случае которых требуется введение лекарственных средств и последующее наблюдение за пациентом в больнице, при этом ограничивается их регулярное профилактическое применение для долгосрочного контроля заболевания. Таким образом, в отсутствие схем, согласно которым препараты можно вводить безопасно, эффективно и с помощью более удобных путей, и схем для лечения приступов ангионевротического отека и профилактического контроля рецидивирующих приступов у большей части пациентов, в том числе беременных женщин и детей, существует потребность в альтернативных видах терапии для субъектов, страдающих НАЕ.

Соответственно, в данной области существует потребность в композициях и способах ингибирования тромбоза у субъекта с риском образования тромба, такого как субъект с наследственным, приобретенным или обусловленным факторами окружающей среды риском образования тромба.

#### **Краткое описание изобретения**

В настоящем изобретении предусмотрены композиции на основе iRNA, которые обеспечивают опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена плазменного калликреина В (фактора Флетчера) 1 (KLKB1), РНК-транскриптов гена фактора XII (F12) или РНК-транскриптов гена кининогена (KNG1). Если не указано иное и с целью упрощения тер-

мин "ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови", используемый в данном документе, относится к гену KLKB1, гену F12 или гену KNG1. Ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, может находиться в клетке, например в клетке организма такого субъекта, как человек.

Соответственно, в одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены средства (для RNAi) на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для ингибирования экспрессии фактора XII (фактора Хагемана) (F12), где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 9, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 10.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены средства (для RNAi) на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для ингибирования экспрессии фактора XII (фактора Хагемана) (F12), где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из табл. 9, 10, 19C, 19D, 20, 21, 23, 24, 26 и 27.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены средства (для RNAi) на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для ингибирования экспрессии фактора XII (фактора Хагемана) (F12), где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 2000-2060 из SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 2000-2030 из SEQ ID NO: 9. В других вариантах осуществления антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 2030-2060 из SEQ ID NO: 9. В одном варианте осуществления антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 2010-2040 из SEQ ID NO: 9. В одном варианте осуществления антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 2010-2035 из SEQ ID NO: 9. В другом варианте осуществления антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 2015-2040 из SEQ ID NO: 9. В другом варианте осуществления антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 2015-2040 из SEQ ID NO: 9. В другом варианте осуществления антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 2020-2050 из SEQ ID NO: 9. В другом варианте осуществления антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 2020-2045 из SEQ ID NO: 9. В еще одних вариантах осуществления антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из последовательностей в диапазонах SEQ ID NO: 9, представленных в табл. 24. В одном варианте осуществления антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 2018-2040 из SEQ ID NO: 9. В одном варианте осуществления антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности антисмысловой нити AD-67244 (5'-UUCAAAAGCACUUUAUUGAGUUUC-3') (SEQ ID NO: 25). В одном варианте осуществления смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность смысловой нити AD-67244. В некоторых вариантах осуществления участок комплементарности содержит 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 2015-2040 из SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления участок комплементарности содержит 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 2015-2045 из SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления участок комплементарности содержит 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 2018-2040 из SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления участок комплементарности содержит 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 2018-2045 из SEQ ID NO: 9. В одном варианте осуществления средство содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид. В другом варианте осуществления все нуклеотиды указанного средства представляют собой модифицированные нуклеотиды. В одном варианте осуществления средство допол-

нительно содержит лиганд, например, лиганд, присоединенный к 3'-концу смысловой нити. В одном варианте осуществления длина каждой из смысловой нити и антисмысловой нити независимо составляет 15-30 нуклеотидов. В другом варианте осуществления длина каждой из смысловой нити и антисмысловой нити независимо составляет 19-25 нуклеотидов.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены средства (для RNAi) на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для ингибирования экспрессии плазменного калликреина В (фактора Флетчера) 1 (KLKB1), где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 1, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 2.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены средства (для RNAi) на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для ингибирования экспрессии плазменного калликреина В (фактора Флетчера) 1 (KLKB1), где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из табл. 3, 4, 19А или 19В.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены средства (для RNAi) на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для ингибирования экспрессии кининогена 1 (KNG1), где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 17, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 18.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены средства (для RNAi) на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для ингибирования экспрессии кининогена 1 (KNG1), где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из табл. 15, 16, 19Е или 19F.

В одном варианте осуществления антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из табл. 3, 4, 9, 10, 15, 16, 19А, 19В, 19С, 19D, 19Е, 19F, 20, 21, 23, 24, 26 и 27.

В одном варианте осуществления двухнитевые средства для RNAi, предусмотренные в данном документе, содержат по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены средства (для RNAi) на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для ингибирования экспрессии плазменного калликреина В (фактора Флетчера) 1 (KLKB1), где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 1, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 2, где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, и где смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены средства (для RNAi) на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для ингибирования экспрессии фактора XII (фактора Хагемана) (F12), где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 9, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 10, где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, и где смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены средства (для RNAi) на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для ингибирования экспрессии кининогена 1 (KNG1), где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 17, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 18, где практически все нуклеотиды смысловой

нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, и где смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу.

В определенных вариантах осуществления dsRNA содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид. В определенных вариантах осуществления dsRNA содержит не более 4 (т.е. 4, 3, 2, 1 или 0) немодифицированных нуклеотидов в смысловой нити. В определенных вариантах осуществления dsRNA содержит не более 4 (т.е. 4, 3, 2, 1 или 0) немодифицированных нуклеотидов в антисмысловой нити. В определенных вариантах осуществления dsRNA содержит не более 4 (т.е. 4, 3, 2, 1 или 0) немодифицированных нуклеотидов как в смысловой нити, так и в антисмысловой нити. В определенных вариантах осуществления все нуклеотиды в смысловой нити dsRNA представляют собой модифицированные нуклеотиды. В определенных вариантах осуществления все нуклеотиды в антисмысловой нити dsRNA представляют собой модифицированные нуклеотиды. В определенных вариантах осуществления все нуклеотиды в смысловой нити dsRNA и все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксимодифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидроксил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего не встречающееся в природе основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфоротиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, и нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата, например, винилфосфат.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из 2'-О-метил- и 2'-фтор-модификаций.

В определенных вариантах осуществления антисмысловая нить двухнитевых средств для RNAi любого из аспектов настоящего изобретения содержит не более 8 2'-фтор-модификаций, не более 7 2'-фтор-модификаций, не более 6 2'-фтор-модификаций, не более 5 2'-фтор-модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций, не более 3 2'-фтор-модификаций, не более 2 2'-фтор-модификаций, не более 1 2'-фтор-модификации или не более 1 2'-фтор-модификации. В других вариантах осуществления смысловая нить двухнитевых средств для RNAi любого из аспектов настоящего изобретения содержит не более 6 2'-фтор-модификаций, не более 5 2'-фтор-модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций, не более 3 2'-фтор-модификаций, не более 2 2'-фтор-модификаций, не более 1 2'-фтор-модификации или не более 1 2'-фтор-модификации.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную межнуклеотидную связь. В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi содержит 6-8 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

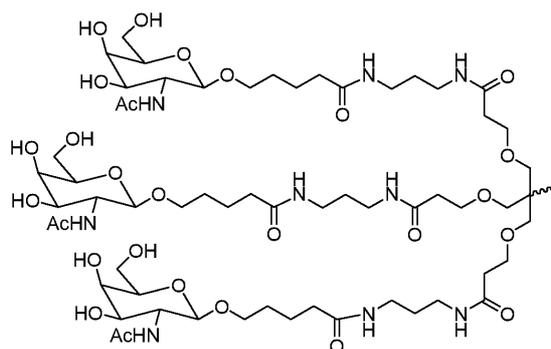
Длина участка комплементарности может составлять по меньшей мере 17 нуклеотидов, 18 нуклеотидов, 19 нуклеотидов, 20 нуклеотидов или 21 нуклеотид.

В определенном варианте осуществления длина участка комплементарности может составлять 19-21 нуклеотид или 21-23 нуклеотида.

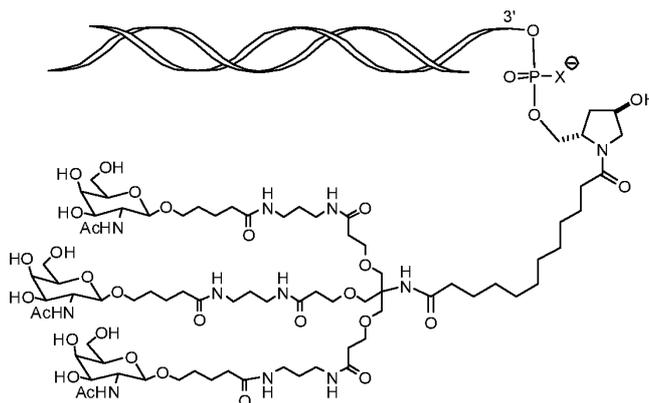
В определенных вариантах осуществления длина каждой нити двухнитевого средства для RNAi составляет не более 30 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина двухнитевого средства для RNAi составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна нить двухнитевого средства для RNAi содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi дополнительно содержит лиганд. В определенных вариантах осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой нити dsRNA. В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc). В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством одновалентного, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера. В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой



В определенных вариантах осуществления dsRNA конъюгирована с лигандом, как показано на следующей схеме:



и где X представляет собой O или S.

В одном варианте осуществления X представляет собой O.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая последовательности выбраны из любой из таких последовательностей, приведенных в любой из табл. 3, 4, 9, 10, 15, 16, 19A, 19B, 19C, 19D, 19E, 19F, 20, 21, 23, 24, 26 и 27.

В одном варианте осуществления участок комплементарности состоит из любой из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из табл. 3, 4, 9, 10, 15, 16, 19A, 19B, 19C, 19D, 19E, 19F, 20, 21, 23, 24, 26 и 27.

В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA, которое ингибирует экспрессию F12, выбрано из группы, состоящей из AD-66170, AD-66173, AD-66176, AD-66125, AD-66172, AD-66167, AD-66165, AD-66168, AD-66163, AD-66116, AD-66126 и AD-67244. В другом варианте осуществления средство на основе dsRNA, которое ингибирует экспрессию F12, представляет собой AD-67244.

В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA, которое ингибирует экспрессию KLKB1, выбрано из группы, состоящей из AD-65077, AD-65170, AD-65103, AD-65083, AD-65087, AD-65149, AD-64652, AD-65162, AD-65153, AD-65084, AD-65099 и AD-66948. В другом варианте осуществления средство на основе dsRNA, которое ингибирует экспрессию KLKB1, представляет собой AD-66948.

В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA, которое ингибирует экспрессию KNG1, выбрано из группы, состоящей из AD-66259, AD-66261, AD-66262, AD-66263, AD-6634 и AD-67344. В другом варианте осуществления средство на основе dsRNA, которое ингибирует экспрессию KNG1, представляет собой AD-67344.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены клетки, содержащие двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующее на KLKB1. В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены клетки, содержащие двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующее на F12. В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены клетки, содержащие двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующее на KNG1.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены векторы, кодирующие по меньшей мере одну нить двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на KLKB1. В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены векторы, кодирующие по меньшей мере одну нить двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на F12. В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены векторы, кодирующие по меньшей мере одну нить двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на KNG1.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции для ин-

гибирования экспрессии гена KLKB1, содержащие двухнитевое средство для RNAi или вектор по настоящему изобретению. В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции для ингибирования экспрессии гена F12, содержащие двухнитевое средство для RNAi или вектор по настоящему изобретению. В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции для ингибирования экспрессии гена KNG1, содержащие двухнитевое средство для RNAi или вектор по настоящему изобретению.

Фармацевтические композиции, предусмотренные в данном документе, можно вводить в незабуференном растворе, например, солевом растворе или воде, или вводить с буферным раствором, например, буферным раствором, содержащим ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В одном варианте осуществления буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (PBS).

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат двухнитевое средство для RNAi, описанное в данном документе, и липидный состав.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы ингибирования экспрессии KLKB1 в клетке. Указанные способы предусматривают приведение клетки в контакт с двухнитевым средством для RNAi или фармацевтической композицией по настоящему изобретению и поддержание клетки в течение времени, достаточного для достижения разрушения мРНК-транскрипта гена KLKB1, за счет чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена KLKB1 в клетке.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы экспрессии F12 в клетке. Указанные способы предусматривают приведение клетки в контакт с двухнитевым средством для RNAi или фармацевтической композицией по настоящему изобретению и поддержание клетки в течение времени, достаточного для достижения разрушения мРНК-транскрипта гена F12, за счет чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена F12 в клетке.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы экспрессии KNG1 в клетке. Указанные способы предусматривают приведение клетки в контакт с двухнитевым средством для RNAi или фармацевтической композицией по настоящему изобретению и поддержание клетки в течение времени, достаточного для достижения разрушения мРНК-транскрипта гена KNG1, за счет чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена KNG1 в клетке.

В одном варианте осуществления клетка находится в организме субъекта, такого как субъект-человек.

В одном варианте осуществления экспрессию KLKB1 ингибируют по меньшей мере на приблизительно 30%, на приблизительно 40%, на приблизительно 50%, на приблизительно 60%, на приблизительно 70%, на приблизительно 80%, на приблизительно 90%, на приблизительно 95%, на приблизительно 98% или на приблизительно 100%.

В одном варианте осуществления экспрессию F12 ингибируют по меньшей мере на приблизительно 30%, на приблизительно 40%, на приблизительно 50%, на приблизительно 60%, на приблизительно 70%, на приблизительно 80%, на приблизительно 90%, на приблизительно 95%, на приблизительно 98% или на приблизительно 100%.

В одном варианте осуществления экспрессию KNG1 ингибируют по меньшей мере на приблизительно 30%, на приблизительно 40%, на приблизительно 50%, на приблизительно 60%, на приблизительно 70%, на приблизительно 80%, на приблизительно 90%, на приблизительно 95%, на приблизительно 98% или на приблизительно 100%.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения субъекта с заболеванием или нарушением, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение уровня экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови. Указанные способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В одном варианте осуществления ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, представляет собой ген KLKB1. В другом варианте осуществления ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, представляет собой ген F12. В еще одном варианте осуществления ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, представляет собой ген KNG1.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта с заболеванием или нарушением, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение уровня экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови. Указанные способы предусматривают введение субъекту профилактически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, за счет чего обеспечивается предупреждение по меньшей мере одного симптома у субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение уровня экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови.

В одном варианте осуществления ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, представляет собой ген KLKB1. В другом варианте осуществления ген, вовлеченный в контактный

путь активации свертывания крови, представляет собой ген F12. В еще одном варианте осуществления ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, представляет собой ген KNG1. В одном варианте осуществления ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, представляет собой ген F12, и способы дополнительно предусматривают введение субъекту двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на KLKB1. В другом варианте осуществления ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, представляет собой ген F12, и способы дополнительно предусматривают введение субъекту двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на KNG1.

В одном варианте осуществления введение субъекту двухнитевого средства для RNAi приводит к снижению уровней брадикинина или снижению активности фактора свертывания крови XII.

В одном варианте осуществления нарушение представляет собой заболевание, ассоциированное с контактным путем активации свертывания крови, такое как тромбофилия, наследственный ангионевротический отек (НАЕ), дефицит фактора Флетчера или первичная гипертензия.

В определенном варианте осуществления по меньшей мере один симптом представляет собой приступ ангионевротического отека или образование тромба.

В одном варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления способы дополнительно предусматривают введение субъекту антитела к KLKB1 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В одном варианте осуществления способы дополнительно предусматривают измерение уровней брадикинина и/или фактора свертывания крови XII у субъекта.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы ингибирования экспрессии F12 у субъекта. Указанные способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на F12, за счет чего обеспечивается ингибирование экспрессии F12 у субъекта.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы ингибирования экспрессии KLKB1 у субъекта. Указанные способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на KLKB1, за счет чего обеспечивается ингибирование экспрессии KLKB1 у субъекта.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы ингибирования экспрессии KNG1 у субъекта. Указанные способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на KNG1, за счет чего обеспечивается ингибирование экспрессии KNG1 у субъекта.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения субъекта с тромбофилией. Указанные способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на F12, или фармацевтической композиции, содержащей двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующее на F12, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта с тромбофилией. Указанные способы включают введение субъекту профилактически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на F12, или фармацевтической композиции, содержащей двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующее на F12, за счет чего обеспечивается предупреждение по меньшей мере одного симптома у субъекта.

В одном варианте осуществления способы дополнительно предусматривают введение субъекту двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на KLKB1. В другом варианте осуществления способы дополнительно предусматривают введение субъекту двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на KNG1.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения субъекта с наследственным ангионевротическим отеком (НАЕ). Указанные способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на F12, или фармацевтической композиции, содержащей двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующее на F12, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта с наследственным ангионевротическим отеком (НАЕ). Указанные способы предусматривают введение субъекту профилактически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на F12, или фармацевтической композиции, содержащей двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующее на F12, за счет чего обеспечивается предупреждение по меньшей мере одного симптома у субъекта.

В одном варианте осуществления способы дополнительно предусматривают введение субъекту

двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на KLKB1. В другом варианте осуществления способы дополнительно предусматривают введение субъекту двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на KNG1.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы предупреждения образования тромба у субъекта с риском образования тромба. Указанные способы включают введение субъекту профилактически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на F12, или фармацевтической композиции, содержащей двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующее на F12, за счет чего обеспечивается ингибирование образования тромба у субъекта с риском образования тромба.

В одном варианте осуществления у субъекта с риском образования тромба имеется заболевание или нарушение, ассоциированное с контактным путем активации свертывания крови.

В одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с контактным путем активации свертывания крови, представляет собой тромбофилию. В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с контактным путем активации свертывания крови, представляет собой наследственный ангионевротический отек (HAE).

В других вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с контактным путем активации свертывания крови, представляет собой дефицит фактора Флетчера или первичную гипертензию.

В одном варианте осуществления субъект с риском образования тромба выбран из группы, состоящей из пациента хирургического профиля; пациента, получающего терапию; субъекта с беременностью; субъекта в послеродовом периоде; субъекта, у которого ранее уже был тромб; субъекта, получающего гормонозаместительную терапию; субъекта, находящегося в сидячем положении в течение длительных периодов, и субъекта с ожирением.

В одном варианте осуществления способы дополнительно предусматривают введение субъекту двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на KLKB1. В другом варианте осуществления способы дополнительно предусматривают введение субъекту двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на KNG1.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы предупреждения приступа ангионевротического отека у субъекта с наследственным ангионевротическим отеком (HAE). Указанные способы предусматривают введение субъекту профилактически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на F12, или фармацевтической композицией, содержащей двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующее на F12, за счет чего обеспечивается предупреждение приступа ангионевротического отека.

В одном варианте осуществления способы дополнительно предусматривают введение субъекту двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на KLKB1. В другом варианте осуществления способы дополнительно предусматривают введение субъекту двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на KNG1.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 представлен график, на котором показана супрессия мРНК KLKB1 у мышей дикого типа после одной подкожной дозы 1 или 3 мг/кг указанных средств в дни 7-10 после введения дозы.

На фиг. 2 представлен график, на котором показана супрессия мРНК F12 у мышей дикого типа после одной подкожной дозы 1 мг/кг, или одной дозы 3 мг/кг, или одной дозы 1 мг/кг, или одной дозы 10 мг/кг указанных средств в дни 7-10 после введения дозы.

На фиг. 3 представлен график, на котором показана супрессия мРНК KNG1 у мышей дикого типа после одной подкожной дозы 1 мг/кг или 3 мг/кг указанных средств в дни 7-10 после введения дозы.

На фиг. 4А представлен график, на котором показано количество синего красителя Эванса в крови мышей, которым вводили одну дозу 0, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг AD-66948 и каптоприла в день 7 после введения дозы.

На фиг. 4В представлен график, на котором показано количество синего красителя Эванса в кишечнике мышей, которым вводили одну дозу 0, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг AD-66948 и каптоприла в день 7 после введения дозы.

На фиг. 4С представлен график, на котором показана супрессия мРНК KLKB1 в печени мышей, которым вводили одну дозу 0, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг AD-66948 и каптоприла в день 7 после введения дозы.

На фиг. 4D представлен график, на котором показана относительная проницаемость кишечника у мышей, которым вводили одну дозу 0, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг AD-66948 и каптоприла в день 7 после введения дозы.

На фиг. 5А представлен график, на котором показано количество синего красителя Эванса в крови мышей, которым вводили одну дозу 0, 0,1, 0,3, 1 или 3 мг/кг AD-67244 и каптоприла в день 7 после введения дозы.

На фиг. 5B представлен график, на котором показано количество синего красителя Эванса в кишечнике мышей, которым вводили одну дозу 0, 0,1, 0,3, 1 или 3 мг/кг AD-67244 и каптоприла в день 7 после введения дозы.

На фиг. 5C представлен график, на котором показана супрессия мРНК F12 в печени мышей, которым вводили одну дозу 0, 0,1, 0,3, 1 или 3 мг/кг AD-67244 и каптоприла в день 7 после введения дозы.

На фиг. 5D представлен график, на котором показана относительная проницаемость кишечника у мышей, которым вводили одну дозу 0, 0,1, 0,3, 1 или 3 мг/кг AD-67244 и каптоприла в день 7 после введения дозы.

На фиг. 6A представлен график, на котором показано количество синего красителя Эванса в крови мышей, которым вводили одну дозу 0, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг AD-67344 и каптоприла в день 7 после введения дозы.

На фиг. 6B представлен график, на котором показано количество синего красителя Эванса в кишечнике мышей, которым вводили одну дозу 0, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг AD-67344 и каптоприла в день 7 после введения дозы.

На фиг. 6C представлен график, на котором показана супрессия мРНК KNG1 в печени мышей, которым вводили одну дозу 0, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг AD-67344 и каптоприла в день 7 после введения дозы.

На фиг. 6D представлен график, на котором показана относительная проницаемость кишечника у мышей, которым вводили одну дозу 0, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг AD-67344 и каптоприла в день 7 после введения дозы.

На фиг. 7 показаны последовательности с модифицированными нуклеотидами в указанных двухнитевых средствах для RNAi, целенаправленно воздействующих на ген KLKB1. F представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид; OMe представляет собой 2'-О-метил- (2'-OMe) модифицированный нуклеотид; и s представляет собой фосфоротиоатную связь. На фигуре соответственно раскрываются SEQ ID NO: 2285-2302 в порядке упоминания.

На фиг. 8 показаны последовательности с модифицированными нуклеотидами в указанных двухнитевых средствах для RNAi, целенаправленно воздействующих на ген F12. F представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид; OMe представляет собой 2'-О-метил- (2'-OMe) модифицированный нуклеотид; и s представляет собой фосфоротиоатную связь. На фигуре соответственно раскрываются SEQ ID NO: 2303-2320 в порядке упоминания.

На фиг. 9 показаны последовательности с модифицированными нуклеотидами в указанных двухнитевых средствах для RNAi, целенаправленно воздействующих на ген KNG1. F представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид; OMe представляет собой 2'-О-метил- (2'-OMe) модифицированный нуклеотид; и s представляет собой фосфоротиоатную связь. На фигуре соответственно раскрываются SEQ ID NO: 2321-2332 в порядке упоминания.

На фиг. 10A представлен график, на котором показано количество синего красителя Эванса в тканях уха каждой из мышей, которым вводили одну дозу 0,1, 0,5 или 3 мг/кг AD-67244 в комбинации с одной дозой 10 мг/кг средства на основе dsRNA, целенаправленно воздействующего C1-INH, в день 7 после введения дозы. Планки погрешностей=стандартное отклонение.

На фиг. 10B представлен график, на котором показана дозозависимая супрессия мРНК F12 после введения одной дозы 0,1, 0,5 или 3 мг/кг AD-67244 в комбинации с одной дозой 10 мг/кг средства на основе dsRNA, целенаправленно воздействующего C1-INH, в день 7 после введения дозы.

На фиг. 11 представлен график, на котором показана супрессия белка F12 в плазме крови самок обезьян *Сynomolgus*, которым подкожно вводили одну дозу 3, 1, 0,3 или 0,1 мг/кг AD-67244. Приведенные уровни F12 в плазме крови представляют собой относительные уровни белка F12, которые нормализовали по среднему значению исходного уровня белка F12 до введения дозы. Планки погрешностей=стандартное отклонение.

На фиг. 12 представлен график, на котором показана супрессия белка F12 в плазме крови мышей дикого типа, которым подкожно вводили одну дозу 0,5 мг/кг AD-67244 или AD-74841.

На фиг. 13 представлен график, показывающий эффект 5'-концевых модификаций в отношении *in vivo* эффективности указанных средств.

#### **Подробное описание изобретения**

В настоящем изобретении предусмотрены композиции на основе iRNA, которые обеспечивают опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (т.е. гена плазменного калликреина В (фактора Флетчера) 1 (KLKB1), гена фактора XII (фактора Хагемана) (F12) или гена кининогена 1 (KNG1)). Ген может находиться в клетке, например, в клетке организма субъекта, такого как человек. Применение этих iRNA обеспечивает возможность целенаправленного разрушения мРНК соответствующего гена (гена KLKB1, гена F12 или гена KNG1) у млекопитающих.

Средства для RNAi по настоящему изобретению были разработаны для целенаправленного воздействия на кодирующие белок и 3'-UTR-участки гена KLKB1 человека, в том числе части гена, которые являются консервативными среди ортологов KLKB1 других видов млекопитающих. Не ограничиваясь какой-либо теорией, предполагают, что комбинация или субкомбинация вышеуказанных свойств, и кон-

кретных целевых участков, и/или конкретных модификаций в таких средствах для RNAi придает средствам для RNAi по настоящему изобретению улучшенную эффективность, стабильность, активность, продолжительность действия и безопасность.

iRNA по настоящему изобретению могут предусматривать нить РНК (антисмысловую нить), содержащую участок, длина которого составляет приблизительно 30 нуклеотидов или меньше, например длина составляет 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида, при этом участок практически комплементарен по меньшей мере части мРНК-транскрипта гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, т.е. гена KLKB1, гена F12 или гена KNG1.

В определенных вариантах осуществления iRNA по настоящему изобретению содержат нить РНК (антисмысловую нить), которая может включать в себя более длинные отрезки, например, длиной до 66 нуклеотидов, например 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 нуклеотида, с участком по меньшей мере из 19 смежных нуклеотидов, который практически комплементарен по меньшей мере части мРНК-транскрипта гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, т.е. гена KLKB1, гена F12 или гена KNG1. Эти iRNA с антисмысловыми нитями большей длины предпочтительно содержат вторую нить РНК (смысловую нить) длиной 20-60 нуклеотидов, где смысловая и антисмысловая нити образуют дуплекс из 18-30 смежных нуклеотидов.

С помощью *in vitro* и *in vivo* анализов авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что iRNA, целенаправленно воздействующие на ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, могут эффективно опосредовать RNAi, что приводит в результате к значительному ингибированию экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, т.е. гена KLKB1, гена F12 или гена KNG1. Авторы настоящего изобретения также продемонстрировали, что средства для RNAi по настоящему изобретению исключительно стабильны в цитоплазме и лизосоме. Таким образом, способы и композиции, предусматривающие эти iRNA, применимы для лечения субъекта с заболеванием или нарушением, ассоциированными с контактным путем активации свертывания крови, например, тромбофилией, HAE, а также для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта с заболеванием или нарушением, ассоциированных с контактным путем активации свертывания крови, или субъекта с риском развития заболевания или нарушения, ассоциированных с контактным путем активации свертывания крови.

Соответственно, в настоящем изобретении также предусмотрены способы лечения субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие ингибирование или снижение уровня экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, например, заболеванием, ассоциированным с контактным путем активации свертывания крови, таким как тромбофилия или наследственный ангионевротический отек (HAE), с применением композиций на основе iRNA, которые обеспечивают опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови.

Очень низкие дозировки iRNA по настоящему изобретению могут, в частности, специфично и эффективно опосредовать РНК-интерференцию (RNAi), приводя в результате к значительному ингибированию экспрессии соответствующего гена (гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови).

В следующем подробном описании раскрывается, как получать и применять композиции, содержащие iRNA, для ингибирования экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (т.е. гена KLKB1, гена F12 или гена KNG1), а также композиции, пути применения и способы лечения субъектов с заболеваниями и нарушениями, на которые будет оказывать благоприятное воздействие ингибирование и/или снижение уровня экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (т.е. гена KLKB1, гена F12, или гена KNG1).

#### 1. Определения.

Для более легкого понимания настоящего изобретения сперва приведены определения некоторых терминов. Кроме того, следует отметить, что во всех случаях перечисления значения или диапазона значений параметра подразумевают, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Форму единственного числа используют в данном документе для обозначения одного или нескольких (т.е. по меньшей мере одного) грамматических объектов данной заявки. В качестве примера "элемент" означает один элемент или несколько элементов, например множество элементов.

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

Термин "или" используют в данном документе для обозначения термина "и/или" и используют взаимозаменяемо с ним, если контекст явно не указывает иное.

Термин "по меньшей мере" перед числовым значением или группой числовых значений понимают как включающий числовое значение, находящееся рядом с термином "по меньшей мере", и все следую-

щие числовые значения или целые числа, которые могут быть по логике включены, что ясно из контекста. Например, число нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты должно быть целым числом. Например, "по меньшей мере 18 нуклеотидов молекулы нуклеиновой кислоты из 21 нуклеотида" означает, что указанным свойством обладают нуклеотиды 18, 19, 20 или 21. Если "по меньшей мере" находится перед группой числовых значений или диапазоном, следует понимать, что "по меньшей мере" может модифицировать числовые значения в группе или диапазоне.

Используемые в данном документе диапазоны включают как верхний так и нижний пределы.

Как используется в данном документе, "плазменный калликреин В (фактор Флетчера) 1", используемый взаимозаменяемо с терминами "прекалликреин" и "KLKB1," относится к встречающемуся в природе гену, который кодирует зимогенную форму калликреина, прекалликреин. С помощью F12a плазменный прекалликреин превращается в плазменный калликреин (также называемый активным калликреином) и посредством протеолитического действия способствует высвобождению брадикинина из высокомолекулярного кининогена и активирует F12. Брадикинин представляет собой пептид, который повышает проницаемость сосудов и присутствует у пациентов с НАЕ при высоких уровнях. Аминокислотную и полную кодирующую последовательности эталонной последовательности гена KLKB1 можно найти, например, в GenBank с номером доступа GI:78191797 (эталонная последовательность с номером доступа NM\_000892.3; SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2). Ортологи млекопитающих гена KLKB1 человека можно найти, например, в GenBank с номерами доступа GI:544436072 (эталонная последовательность с номером доступа XM\_005556482, макака-крабеда; SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8); GI:380802470 (эталонная последовательность с номером доступа JU329355, макака-резуса); GI:236465804 (эталонная последовательность с номером доступа NM\_008455, мыши; SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4); GI:162138904 (эталонная последовательность с номером доступа NM\_012725, крысы; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6).

Дополнительные примеры последовательностей мРНК KLKB1 всегда доступны в общедоступных базах данных, например, в GenBank, UniProt и OMIM.

Как используется в данном документе, "фактор XII (фактор Хагемана)", используемый взаимозаменяемо с терминами "фактор свертывания крови XII", "FXII", "F12", "активный F12" и "F12a", относится к встречающемуся в природе гену, который кодирует зимогенную форму F12a. F12 представляет собой фермент (EC 3.4.21.38) класса сериновых протеаз (или сериновых эндопептидаз), который расщепляет прекалликреин с образованием калликреина, который затем способствует высвобождению брадикинина из высокомолекулярного кининогена и активирует F12. Аминокислотную и полную кодирующую последовательности эталонной последовательности гена F12 можно найти, например, в GenBank с номером доступа GI:145275212 (эталонная последовательность с номером доступа NM\_000505; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10). Ортологи млекопитающих гена F12 человека можно найти, например, в GenBank с номерами доступа GI:544441267 (эталонная последовательность с номером доступа XM\_005558647, макака-крабеда SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12); GI:805299477 (эталонная последовательность с номером доступа NM\_021489, мыши; SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14); GI:62078740 (эталонная последовательность с номером доступа NM\_001014006, крысы; SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16).

Дополнительные примеры последовательностей мРНК F12 всегда доступны в общедоступных базах данных, например, в GenBank, UniProt и OMIM.

Как используется в данном документе, "кининоген 1", используемый взаимозаменяемо с терминами "фактор Фитцджеральда", "фактор Уильямса-Фитцджеральда-Фложе", "высокомолекулярный кининоген" ("HMWK" или "HK"), "низкомолекулярный кининоген" ("LMWK") и "KNG1", относится к встречающемуся в природе гену, который подвергается альтернативному сплайсингу с образованием HMWK и LMWK. За счет расщепления HMWK активным калликреином высвобождается брадикинин. Аминокислотную и полную кодирующую последовательности эталонной последовательности гена KNG1 можно найти, например, в GenBank с номером доступа GI:262050545 (эталонная последовательность с номером доступа NM\_001166451; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18). Ортологи млекопитающих гена KNG1 человека можно найти, например, в GenBank с номерами доступа GI:544410550 (эталонная последовательность с номером доступа XM\_005545463, макака-крабеда SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20); GI:156231028 (эталонная последовательность с номером доступа NM\_001102409, мыши; SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22); GI:80861400 (эталонная последовательность с номером доступа NM\_012696, крысы; SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 23).

Дополнительные примеры последовательностей мРНК KNG1 всегда доступны в общедоступных базах данных, например, в GenBank, UniProt и OMIM.

С целью упрощения используемый в данном документе термин "ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови" означает ген KLKB1, ген F12 или ген KNG1, если не указано иное.

Используемый в данном документе термин "целевая последовательность" относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образующейся в процессе транскрипции гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, включая мРНК, которая является продуктом процессинга РНК первичного продукта транскрипции. В одном варианте осуществления целевая часть последовательности будет по меньшей мере достаточно длинной для того, чтобы служить в качестве субстрата для управляемого iRNA расщепления в этой части или рядом с этой частью нуклеотидной

последовательности молекулы мРНК, образующейся в процессе транскрипции гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови. В одном варианте осуществления целевая последовательность находится в пределах кодирующего белок участка гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови. В другом варианте осуществления целевая последовательность находится в пределах 3'-UTR гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови.

Длина целевой последовательности может составлять приблизительно 9-36 нуклеотидов, например приблизительно 15-30 нуклеотидов. Например, длина целевой последовательности может составлять приблизительно 15-30 нуклеотидов, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления длина целевой последовательности составляет от приблизительно 19 до приблизительно 30 нуклеотидов. В других вариантах осуществления длина целевой последовательности составляет от приблизительно 19 до приблизительно 25 нуклеотидов. В еще одних вариантах осуществления длина целевой последовательности составляет от приблизительно 19 до приблизительно 23 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина целевой последовательности составляет от приблизительно 21 до приблизительно 23 нуклеотидов. Значения диапазона и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше значениям диапазона и длины, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Используемый в данном документе термин "нить, содержащая последовательность" относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которая описывается последовательностью, обозначаемой с использованием стандартной номенклатуры нуклеотидов.

Каждый из "G", "C", "A", "T" и "U", как правило, обозначает нуклеотид, который соответственно содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил в качестве основания. Однако будет понятно, что термин "рибонуклеотид" или "нуклеотид" также может означать модифицированный нуклеотид, более подробно описанный ниже, или имитирующий заменяющий фрагмент (см., например, табл. 2). Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть заменены другими фрагментами практически без изменения свойств образования пар оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такой заменяющий фрагмент. Например, без ограничения нуклеотид, содержащий инозин в качестве основания, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть заменены в нуклеотидных последовательностях dsRNA, представленных в настоящем изобретении, нуклеотидами, содержащими, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любом месте олигонуклеотида могут быть соответственно заменены гуанином и урацилом с образованием неоднозначных пар оснований G-U с целевой мРНК. Последовательности, содержащие такие заменяющие фрагменты, подходят для композиций и способов, представленных в настоящем изобретении.

Термины "iRNA", "средство для RNAi", "средство на основе iRNA", "средство для РНК-интерференции", используемые в данном документе, взаимозаменяемо, относятся к средству, которое содержит РНК, в том значении, в котором этот термин определен в данном документе, и которое опосредует целенаправленное расщепление РНК-транскрипта посредством пути с участием РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC). iRNA управляет специфичным в отношении последовательности разрушением мРНК посредством процесса, который известен как РНК-интерференция (RNAi). iRNA модулирует, например ингибирует, экспрессию гена KLKB1 в клетке, например клетке субъекта, такого как субъект-млекопитающее.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению предусматривает одонитевую РНК, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, т.е. целевой последовательности мРНК KLKB1, целевой последовательности мРНК F12 или целевой последовательности мРНК KNG1, управляя расщеплением целевой РНК. Не ограничиваясь какой-либо теорией, предполагают, что длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, разрушается до siRNA эндонуклеазой III типа, известной под названием Dicer (Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485). Dicer, фермент, подобный рибонуклеазе III типа, обеспечивает процессинг dsRNA до коротких интерферирующих РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными 3'-выступами из двух оснований (Bernstein, et al. (2001) Nature 409:363). siRNA затем встраиваются в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, что позволяет комплементарной антисмысловой нити управлять распознаванием мишени (Nykanen, et al. (2001) Cell 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень для индукции сайленсинга (Elbashir, et al. (2001) Genes Dev. 15:188). Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к одонитевой РНК (siRNA), образующейся внутри клетки и способствующей образованию RISC-комплекса для осуществления сайленсинга целевого гена, т.е. гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови. Соответственно, термин "siRNA" также используют в данном документе для обозначения RNAi, описанной выше.

В другом варианте осуществления средство для RNAi может быть одонитевой siRNA, которую вводят в клетку или организм для ингибирования целевой мРНК. Одонитевые средства для RNAi связываются с Argonaute 2, обладающим эндонуклеазной активностью в комплексе RISC, который затем отщепляет целевую мРНК. Одонитевые siRNA, как правило, содержат 15-30 нуклеотидов и являются химически модифицированными. Конструирование и тестирование одонитевых siRNA описаны в патенте США № 8101348 и в Lima et al. (2012) Cell 150:883-894, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки. Любые антисмысловые нуклеотидные последовательности, описанные в данном документе, можно применять в качестве одонитевой siRNA, которая описана в данном документе, или которая химически модифицирована способами, описанными в Lima et al. (2012) Cell 150:883-894.

В другом варианте осуществления "iRNA" для применения в композициях, путях применения и способах по настоящему изобретению представляет собой двухнитевую РНК, и в данном документе ее называют "двухнитевым средством для RNAi", "молекулой двухнитевой РНК (dsRNA)", "средством на основе dsRNA" или "dsRNA". Термин "dsRNA" относится к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты с дуплексной структурой, содержащему две антипараллельные и практически комплементарные нити нуклеиновой кислоты, рассматриваемые как имеющие "смысловую" и "антисмысловую" ориентации по отношению к целевой РНК, т.е. гену, вовлеченному в контактный путь активации свертывания крови, т.е. гену KLKB1, гену F12 или гену KNG1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения двухнитевая РНК (dsRNA) запускает разрушение целевой РНК, например, мРНК, через пост-транскрипционный механизм сайленсинга генов, называемый в данном документе РНК-интерференцией или RNAi.

Как правило, большинство нуклеотидов каждой нити молекулы dsRNA являются рибонуклеотидами, но, как подробно описано в данном документе, каждая нить или обе нити могут также содержать один или несколько нуклеотидов, не являющихся рибонуклеотидами, например, дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, используемый в настоящем описании термин "средство для RNAi" может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; средство для RNAi может включать значительные модификации множества нуклеотидов. Используемый в данном документе термин "модифицированный нуклеотид" относится к нуклеотиду, независимо имеющему модифицированный сахарный фрагмент, модифицированную межнуклеотидную связь и/или модифицированное нуклеотидное основание. Таким образом, выражение "модифицированный нуклеотид" охватывает замены, добавления или удаления, например функциональной группы или атома, в межнуклеозидных связях, сахарных фрагментах или нуклеотидных основаниях. Модификации, подходящие для применения в средствах по настоящему изобретению, включают все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных в данной области. Любые такие модификации, как используемые в молекуле типа siRNA, охватываемые термином "средство для RNAi" в контексте данных описания и формулы изобретения.

Дуплексный участок может быть любой длины, которая позволяет осуществлять специфическое разрушение требуемой целевой РНК посредством пути с участием RISC, и может варьироваться по длине в диапазоне от приблизительно 9 до 36 пар оснований, например, его длина может составлять приблизительно 15-30 пар оснований, например, приблизительно 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 пар оснований, как, например: приблизительно 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, или 21-22 пары оснований. Значения диапазона и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше значениям диапазона и длины, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Две нити, образующие дуплексную структуру, могут быть различными частями одной большей молекулы РНК, или они могут быть отдельными молекулами РНК. В тех случаях, если две нити являются частью одной более крупной молекулы и, следовательно, соединены непрерывающейся цепью нуклеотидов от 3'-конца одной нити к 5'-концу соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, соединительную цепь РНК называют петлей типа "шпилька". Петля типа "шпилька" может содержать по меньшей мере один неспаренный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления петля типа "шпилька" может содержать по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 23 или больше неспаренных нуклеотидов.

Если две практически комплементарные нити dsRNA образованы отдельными молекулами РНК, то эти молекулы не обязательно должны, но могут быть соединены ковалентно. В тех случаях, если две нити соединены ковалентно иным образом, нежели непрерывающейся цепью нуклеотидов от 3'-конца одной нити к 5'-концу соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, то соединительную структуру называют "линкером". Нити РНК могут иметь одинаковое или разное число нуклеотидов. Максимальное число пар оснований представляет собой число нуклеотидов в самой короткой нити dsRNA за вычетом каких-либо выступающих концов, которые присутствуют в дуплексе. Помимо дуплекса-

ной структуры средство для RNAi может содержать один или несколько нуклеотидных выступающих концов.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению представляет собой dsRNA из 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, т.е. целевой последовательности мРНК KLKB1, целевой последовательности мРНК F12 или целевой последовательности мРНК KNG1, управляя расщеплением целевой РНК. Не ограничиваясь теорией, длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, разрезается на siRNA эндонуклеазой III типа, известной под названием Dicer (Sharp et al. (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, фермент, подобный рибонуклеазе III типа, обеспечивает процессинг dsRNA до коротких интерферирующих РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными 3'-выступающими концами из двух оснований (Bernstein, et al. (2001) *Nature* 409:363). siRNA затем встраиваются в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, что позволяет комплементарной антисмысловой нити управлять распознаванием мишени (Nykanen, et al. (2001) *Cell* 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень для индукции сайленсинга (Elbashir, et al. (2001) *Genes Dev.* 15:188).

Используемый в данном документе термин "нуклеотидный выступающий конец" относится по меньшей мере к одному неспаренному нуклеотиду, который выступает из дуплексной структуры iRNA, например dsRNA. Например, если 3'-конец одной нити dsRNA выходит за пределы 5'-конца другой нити или наоборот, то образуется нуклеотидный выступающий конец. dsRNA может содержать выступающий конец по меньшей мере из одного нуклеотида; альтернативно выступающий конец может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или больше. Нуклеотидный выступающий конец может содержать аналог нуклеотида/нуклеозида, в том числе дезоксинуклеотид/нуклеозид, или состоять из него.

Выступающий(выступающие) конец(концы) может(могут) находиться в пределах смысловой нити, антисмысловой нити или их комбинации. Кроме того, нуклеотид(нуклеотиды) выступающего конца может(могут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах антисмысловой или смысловой нити dsRNA.

В одном варианте осуществления антисмысловая нить dsRNA содержит 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, выступающих на 3'-конце и/или 5'-конце. В одном варианте осуществления смысловая нить dsRNA содержит 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, выступающих на 3'-конце и/или 5'-конце. В другом варианте осуществления один или несколько нуклеотидов выступающего конца заменены нуклеозидтиофосфатом.

В определенных вариантах осуществления выступающий конец в пределах смысловой нити или антисмысловой нити, или обеих, может содержать продленные отрезки длиной более 10 нуклеотидов, например, длиной 1-30 нуклеотидов, 2-30 нуклеотидов, 10-30 нуклеотидов или 10-15 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления продленный выступающий конец присутствует в пределах смысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления продленный выступающий конец присутствует на 3'-конце смысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления продленный выступающий конец присутствует на 5'-конце смысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления продленный выступающий конец присутствует в пределах антисмысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления продленный выступающий конец присутствует на 3'-конце антисмысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления продленный выступающий конец присутствует на 5'-конце антисмысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления один или несколько нуклеотидов выступающего конца заменены нуклеозидтиофосфатом. В определенных вариантах осуществления выступающий конец содержит самокомплементарную часть, так что выступающий конец способен образовывать шпильчатую структуру, которая является стабильной в физиологических условиях.

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

Термин "антисмысловая нить" или "направляющая нить" относится к нити iRNA, например dsRNA, которая содержит участок, практически комплементарный целевой последовательности, например мРНК KLKB1. Используемый в данном документе термин "участок комплементарности" относится к участку на антисмысловой нити, практически комплементарному последовательности, например целевой последовательности, например нуклеотидной последовательности гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, определенного в данном документе. В тех случаях, когда участок комплементарности не полностью комплементарен целевой последовательности, во внутренних или концевых уча-

стках молекулы могут присутствовать ошибки спаривания. Как правило, наиболее допустимые ошибки спаривания находятся в концевых участках, например, в пределах 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида 5'- и/или 3'-конца iRNA. В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению предусматривает ошибочное спаривание нуклеотидов в антисмысловой нити. В другом варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению предусматривает ошибочное спаривание нуклеотидов в смысловой нити. В одном варианте осуществления ошибочное спаривание нуклеотидов происходит, например, в пределах 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида от 3'-конца iRNA. В другом варианте осуществления ошибочное спаривание нуклеотидов происходит, например, по 3'-концевому нуклеотиду iRNA.

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

Используемый в данном документе термин "участок расщепления" относится к участку, который непосредственно прилегает к сайту расщепления. Сайт расщепления является сайтом в мишени, по которому происходит расщепление. В некоторых вариантах осуществления участок расщепления содержит три основания на любом из концов сайта расщепления, который непосредственно прилегает к нему. В некоторых вариантах осуществления участок расщепления содержит два основания на любом из концов сайта расщепления, который непосредственно прилегает к нему. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления, в частности, находится в сайте, граничащем с нуклеотидами 10 и 11 антисмысловой нити, и участок расщепления содержит нуклеотиды 11, 12 и 13.

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

Комплементарные последовательности в iRNA, например в dsRNA, описанной в данном документе, предусматривают образование пар оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую полинуклеотидную последовательность, и олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего вторую нуклеотидную последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. В данном документе такие последовательности могут называться "полностью комплементарными" по отношению друг к другу. Тем не менее, если в данном документе первую последовательность называют "практически комплементарной" по отношению ко второй последовательности, тогда две последовательности могут быть полностью комплементарными или в них может происходить ошибочное спаривание одной или нескольких, но, как правило, не более 5, 4, 3 или 2 пар оснований при гибридизации с образованием дуплекса размером до 30 пар оснований, сохраняя при этом способность к гибридизации в условиях, наиболее соответствующих их конечному применению, например ингибированию экспрессии гена посредством пути с участием RISC. Однако когда два олигонуклеотида сконструированы с тем, чтобы образовывать при гибридизации один или несколько одностебельных выступающих концов, то такие выступающие концы не будут считаться несовпадениями применительно к определению комплементарности. Например, dsRNA, содержащая один олигонуклеотид длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид длиной 23 нуклеотида, где более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, может при этом называться "полностью комплементарной" для целей, описанных в данном документе.

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

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

Как используется в данном документе, полинуклеотид, который "практически комплементарен по

меньшей мере части" матричной РНК (мРНК), относится к полинуклеотиду, который практически комплементарен непрерывной части представляющей интерес мРНК (например, мРНК, которую кодирует ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови). Например, полинуклеотид является комплементарным по меньшей мере части мРНК KLKB1, если последовательность практически комплементарна непрерывающейся части мРНК, кодирующей KLKB1.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды смысловой и антисмысловой нитей, раскрытые в данном документе, полностью комплементарны последовательности целевого гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови.

В одном варианте осуществления антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, полностью комплементарны целевой последовательности KLKB1. В других вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, практически комплементарны целевой последовательности KLKB1 и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентному участку нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1 и 2 или фрагмента любой из SEQ ID NO: 1 и 2, например, комплементарна на приблизительно 85%, на приблизительно 86%, на приблизительно 87%, на приблизительно 88%, на приблизительно 89%, на приблизительно 90%, на приблизительно 91%, на приблизительно 92%, на приблизительно 93%, на приблизительно 94%, на приблизительно 95%, на приблизительно 96%, на приблизительно 97%, на приблизительно 98% или на приблизительно 99%.

В других вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, практически комплементарны целевой последовательности KLKB1 и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей смысловой нити в любой из табл. 3, 4, 19А или 19В, или фрагменту любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой нити в любой из табл. 3, 4, 19А или 19В, например, комплементарна на приблизительно 85%, на приблизительно 86%, на приблизительно 87%, на приблизительно 88%, на приблизительно 89%, на приблизительно 90%, на приблизительно 91%, на приблизительно 92%, на приблизительно 93%, на приблизительно 94%, на приблизительно 95%, на приблизительно 96%, на приблизительно 97%, на приблизительно 98% или на приблизительно 99%.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит смысловую нить, которая практически комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, комплементарен целевой последовательности KLKB1 и содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой нити в любой из табл. 3, 4, 19А или 19В, или фрагменту любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой нити в любой из табл. 3, 4, 19А или 19В, например, комплементарна на приблизительно 85%, на приблизительно 86%, на приблизительно 87%, на приблизительно 88%, на приблизительно 89%, на приблизительно 90%, на приблизительно 91%, на приблизительно 92%, на приблизительно 93%, на приблизительно 94%, на приблизительно 95%, на приблизительно 96%, на приблизительно 97%, на приблизительно 98% или на приблизительно 99%.

В одном варианте осуществления антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, полностью комплементарны целевой последовательности F12. В других вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, практически комплементарны целевой последовательности F12 и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентному участку нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 9 или 10 или фрагмента из SEQ ID NO: 9 или 10, например, комплементарна на приблизительно 85%, на приблизительно 86%, на приблизительно 87%, на приблизительно 88%, на приблизительно 89%, на приблизительно 90%, на приблизительно 91%, на приблизительно 92%, на приблизительно 93%, на приблизительно 94%, на приблизительно 95%, на приблизительно 96%, на приблизительно 97%, на приблизительно 98% или на приблизительно 99%.

В другом варианте осуществления полинуклеотиды антисмысловой нити практически комплементарны целевой последовательности F12 и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей смысловой нити в любой из табл. 9, 10, 19С, 19D, 20, 21, 23, 24, 26 и 27 или фрагменту любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой нити в любой из табл. 9, 10, 19С, 19D, 20, 21, 23, 24, 26 и 27, например, комплементарна на приблизительно 85%, на приблизительно 86%, на приблизительно 87%, на приблизительно 88%, на приблизительно 89%, на приблизительно 90%, на приблизительно 91%, на приблизительно 92%, на приблизительно 93%, на приблизительно 94%, на приблизительно 95%, на приблизительно 96%, на приблизительно 97%, на приблизительно 98% или на приблизительно 99%.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит смысловую нить, которая практически комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, комплементарен целевой последовательности F12 и содержит непрерывную нуклеотидную по-

следовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой нити в любой из табл. 9, 10, 19C, 19D, 20, 21, 23, 24, 26, и 27 или фрагменту любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой нити в любой из табл. 9, 10, 19C, 19D, 20, 21, 23, 24, 26 и 27, например, комплементарна на приблизительно 85%, на приблизительно 86%, на приблизительно 87%, на приблизительно 88%, на приблизительно 89%, на приблизительно 90%, на приблизительно 91%, на приблизительно 92%, на приблизительно 93%, на приблизительно 94%, на приблизительно 95%, на приблизительно 96%, на приблизительно 97%, на приблизительно 98% или на приблизительно 99%.

В одном варианте осуществления полинуклеотиды смысловой нити и полинуклеотиды антисмысловой нити, раскрытые в данном документе, полностью комплементарны целевой последовательности KNG1. В других вариантах осуществления полинуклеотиды смысловой нити и/или антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, практически комплементарны целевой последовательности KNG1 и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентному участку нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 17 или 18 или фрагмента из SEQ ID NO: 17 или 18, например, комплементарна на приблизительно 85%, на приблизительно 86%, на приблизительно 87%, на приблизительно 88%, на приблизительно 89%, на приблизительно 90%, на приблизительно 91%, на приблизительно 92%, на приблизительно 93%, на приблизительно 94%, на приблизительно 95%, на приблизительно 96%, на приблизительно 97%, на приблизительно 98% или на приблизительно 99%.

В другом варианте осуществления полинуклеотиды антисмысловой нити практически комплементарны целевой последовательности KNG и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей смысловой нити в любой из табл. 15 или 16, например, комплементарна на приблизительно 85%, на приблизительно 86%, на приблизительно 87%, на приблизительно 88%, на приблизительно 89%, на приблизительно 90%, на приблизительно 91%, на приблизительно 92%, на приблизительно 93%, на приблизительно 94%, на приблизительно 95%, на приблизительно 96%, на приблизительно 97%, на приблизительно 98% или на приблизительно 99%.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит смысловую нить, которая практически комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, комплементарен целевой последовательности KNG1 и содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой нити в табл. 15 или 16 или фрагменту любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой нити в табл. 15 или 16, например комплементарна на приблизительно 85%, на приблизительно 86%, на приблизительно 87%, на приблизительно 88%, на приблизительно 89%, на приблизительно 90%, на приблизительно 91%, на приблизительно 92%, на приблизительно 93%, на приблизительно 94%, на приблизительно 95%, на приблизительно 96%, на приблизительно 97%, на приблизительно 98% или на приблизительно 99%.

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

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

Как используется в данном документе, "субъект" представляет собой животное, такое как млекопитающее, в том числе примата (такого как человек, примат, отличный от человека, например, обезьяна и шимпанзе), отличного от примата животного (такого как корова, свинья, верблюд, лама, лошадь, коза, кролик, овца, хомяк, морская свинка, кошка, собака, крыса, мышь, лошадь и кит) или птицу (например, утку или гуся). В одном варианте осуществления субъектом является человек, например, человек, подлежащий лечению или оцениваемый в отношении заболевания, нарушения или состояния, на которые

будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии и/или репликации гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (т.е. экспрессии гена KLKB1, экспрессии гена F12 и/или экспрессии гена KNG1); человек с риском возникновения заболевания, нарушения или состояния, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови; человек с заболеванием, нарушением или состоянием, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови; и/или человек, подлежащий лечению от заболевания, нарушения или состояния, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, как описано в данном документе.

Используемые в данном документе термины "осуществление лечения" или "лечение" относятся к благоприятному или требуемому результату, включающему без ограничения облегчение или ослабление тяжести одного или нескольких симптомов, ассоциированных с экспрессией гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (т.е. экспрессии гена KLKB1, экспрессии гена F12 и/или экспрессии гена KNG1) и/или с продуцированием белка, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (т.е. продуцированием белка KLKB1, продуцированием белка F12 и/или продуцированием белка KNG1), например, тромбофилии, например, образования тромба, наличия повышенного уровня брадикинина, наследственного ангионевротического отека (НАЕ), такого как наследственный ангионевротический отек I типа; наследственный ангионевротический отек II типа; наследственный ангионевротический отек III типа; или любой другой наследственный ангионевротический отек, вызванный повышенными уровнями брадикинина, приступа ангионевротического отека, эдемы конечностей, лица, гортани, верхних дыхательных путей, живота, туловища и половых органов, продрома; опухания гортани; незудящей сыпи; тошноты; рвоты; боли в животе. "Лечение" также может означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в отсутствие лечения.

Термин "более низкий" в контексте уровня экспрессии у субъекта гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, и/или продуцирования белка, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, или маркера или симптома заболевания относится к статистически значимому снижению такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или больше, и предпочтительно до уровня, принятого в качестве находящегося в диапазоне показателей в норме для индивидуума без такого нарушения.

Как используется в данном документе, "предупреждение" или "осуществление предупреждения" при использовании в отношении заболевания, нарушения или состояния, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, и/или продуцирования белка, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, относится к снижению вероятности того, что у субъекта проявится симптом, ассоциированный с таким заболеванием, нарушением или состоянием, или снижению частоты и/или продолжительности симптома, ассоциированного с таким заболеванием, нарушением или состоянием, например, симптома, ассоциированного с экспрессией гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, такого как образование венозного тромба, артериального тромба, тромба в камере сердца, тромбоэмболия, наличие повышенного брадикинина, приступ ангионевротического отека, наследственный ангионевротический отек I типа; наследственный ангионевротический отек II типа; наследственный ангионевротический отек III типа; любой другой наследственный ангионевротический отек, вызванный повышенными уровнями брадикинина; эдема конечностей, лица, гортани, верхних дыхательных путей, живота, туловища и половых органов, продром; опухание гортани; незудящая сыпь; тошнота; рвота; боль в животе. Невозможность развития заболевания, нарушения или состояния, или ослабление развития симптома, ассоциированного с таким заболеванием, нарушением или состоянием (например, по меньшей мере на приблизительно 10% по принятой в клинической практике шкале для этого заболевания или нарушения), или отсрочивание проявления латентных симптомов (например, на несколько дней, недель, месяцев или лет) считается эффективным предупреждением.

Используемый в данном документе термин "заболевание, ассоциированное с контактным путем активации свертывания крови" представляет собой заболевание или нарушение, вызванные или ассоциированные с экспрессией гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (экспрессией гена KLKB1, экспрессией гена F12 и/или экспрессией гена KNG1), или продуцированием белка, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (т.е. продуцированием белка KLKB1, продуцированием белка F12 и/или продуцированием белка KNG1). Термин "заболевание, ассоциированное с контактным путем активации свертывания крови", включает заболевание, нарушение или состояние, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, и/или активности белка, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови. Заболевание, ассоциированное с контактным путем активации свертывания

крови, может представлять собой наследственное нарушение или приобретенное нарушение.

Неограничивающие примеры заболеваний, ассоциированных с контактным путем активации свертывания крови, включают, например, тромбофилию, наследственный ангионевротический отек (НАЕ) (такой как наследственный ангионевротический отек I типа; наследственный ангионевротический отек II типа; наследственный ангионевротический отек III типа; или любой другой наследственный ангионевротический отек, вызванный повышенными уровнями брадикинина), дефицит прекалликреина (наследственный или приобретенный), также известный как дефицит фактора Флетчера, злокачественная первичная гипертензия, гипертензия, терминальная стадия почечной недостаточности.

В одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с контактным путем активации свертывания крови, представляет собой тромбофилию. Используемый в данном документе термин "тромбофилия", также называемый "гиперкоагуляцией" или "протромботическим состоянием", относится к любому заболеванию или нарушению, ассоциированному с аномальным свертыванием крови, которое обуславливает повышение риска тромбоза и развития тромба. Используемый в данном документе термин "тромбоз" относится к процессу локальной коагуляции или свертывания крови (образования "тромба" или "сгустка") в части системы кровообращения. Тромбофилия может быть наследственной, приобретенной или быть следствием воздействия условия окружающей среды. Иллюстративные формы наследственной тромбофилии включают наследственный дефицит антитромбина, наследственный дефицит протеина С, наследственный дефицит протеина S, наследственную тромбофилию, связанную с фактором V Лейдена, и форму с протромбином (фактором II) G20210A. Иллюстративная приобретенная тромбофилия включает антифосфолипидный синдром.

Приобретенные/приобретенные в результате воздействия окружающей среды формы тромбофилии могут быть обусловлены, например, травмой, переломом, оперативным вмешательством, например, ортопедическим оперативным вмешательством, онкологическим оперативным вмешательством, применением пероральных контрацептивов, гормонозаместительной терапией, беременностью, послеродовым периодом, гиперкоагуляцией, предшествующим тромбом, возрастом, обездвиживанием (например, более трех дней постельного режима), длительным путешествием, метаболическим синдромом и загрязнением воздуха (см., например, Previtali, et al. (2011) Blood Transfus 9:120). Соответственно, "субъекты с риском образования тромба" включают пациентов хирургического профиля (например, субъектов, которые перенесли общее хирургическое вмешательство, стоматологическое хирургическое вмешательство, ортопедическое хирургическое вмешательство (например, хирургическое вмешательство по протезированию коленного сустава или тазобедренного сустава), хирургическое вмешательство в связи с травмой, онкологическое хирургическое вмешательство); пациентов, получающих терапию (например, субъектов с заболеванием, требующим обездвиживания, например, субъектов, соблюдающих постельный режим более трех дней, и/или субъектов с долгосрочным применением внутривенного катетера; субъектов с фибрилляцией предсердий; субъектов пожилого возраста; субъектов с нарушением функции почек; субъектов с искусственным клапаном сердца; субъектов с сердечной недостаточностью; субъектов с раком); беременных субъектов; субъектов в послеродовом периоде; субъектов, у которых ранее уже был тромб; субъектов, получающих гормонозаместительную терапию; субъектов, находящихся в сидячем положении в течение длительных периодов времени, например, в самолете или автомобиле; и субъектов с ожирением.

В одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с контактным путем активации свертывания крови, представляет собой наследственный ангионевротический отек (НАЕ). Используемый в данном документе термин "наследственный ангионевротический отек", применяемый взаимозаменяемо с термином "НАЕ", относится к нарушению с аутосомно-доминантным наследованием, обусловленному мутацией в гене C1-ингибитора (C1INH), SERPING1) или в гене фактора свертывания крови XII (F12), которое вызывает у пациентов рецидивирующую эдему. Типичные симптомы НАЕ включают сильное опухание рук, ног, кистей, стопы, лица, языка и гортани, живота, туловища, гениталий, тошноту, рвоту, боль в животе и незудящую сыпь. Во время приступов или эпизодов НАЕ выявляют повышенные уровни пептида брадикинина.

В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с контактным путем активации свертывания крови, представляет собой дефицит прекалликреина.

В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с контактным путем активации свертывания крови, представляет собой злокачественную первичную гипертензию.

В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с контактным путем активации свертывания крови, представляет собой гипертензию.

В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с контактным путем активации свертывания крови, представляет собой терминальную стадию почечной недостаточности.

Подразумевается, что "терапевтически эффективное количество", используемое в данном документе, включает количество средства для RNAi, которого, при введении пациенту для лечения субъекта с НАЕ и/или заболеванием, ассоциированным с контактным путем активации свертывания крови, достаточно для эффективного лечения заболевания (например, путем уменьшения, ослабления или поддержания текущего заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания). "Терапевтически эффек-

тивное количество" может варьироваться в зависимости от средства для RNAi, пути введения средства, заболевания и его тяжести, а также анамнеза заболевания, возраста, веса, семейного анамнеза, генетической характеристики, стадии патологического процесса, опосредованного экспрессией гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, который подлежит лечению.

Подразумевается, что "профилактически эффективное количество", как используется в данном документе, включает количество средства для RNAi, которого, при введении субъекту, у которого еще не возникли или не проявились симптомы заболевания, ассоциированного с контактным путем активации свертывания крови, но у которого может иметься предрасположенность или риск развития заболевания, достаточно для предупреждения или ослабления тяжести заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания. Ослабление тяжести заболевания включает замедление течения болезни или снижение тяжести заболевания, которое разовьется позже. "Профилактически эффективное количество" может варьироваться в зависимости от средства для RNAi, пути введения средства, степени риска развития заболевания и анамнеза заболевания, возраста, веса, семейного анамнеза, генетической характеристики, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, который подлежит лечению.

"Терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" также включает количество средства для RNAi, которое вызывает некоторый желательный локальный или системный эффект при приемлемом соотношении польза/риск, принятом по отношению к любому лечению. Средства для RNAi, применяемые в способах по настоящему изобретению, можно вводить в количестве, достаточном для достижения приемлемого соотношения польза/риск, принятого по отношению к такому лечению.

Термин "образец", используемый в данном документе, предусматривает совокупность сходных жидкостей, клеток или тканей, выделенных из организма субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку крови и серозные жидкости, плазму крови, спинномозговую жидкость, внутриглазные жидкости, лимфу, мочу, слюну и им подобные. Образцы тканей могут включать образцы из тканей, органов или локальных участков. Например, образцы могут быть получены из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток этих органов. В определенных вариантах осуществления образцы могут быть получены из печени (например, всей печени, или определенных сегментов печени, или определенных типов клеток печени, таких как, например, гепатоциты), сетчатки или частей сетчатки (например, пигментного эпителия сетчатки), центральной нервной системы или частей центральной нервной системы (например, желудочков или хориоидного сплетения) или поджелудочной железы или определенных клеток или частей поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" означает спинномозговую жидкость, полученную от субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" означает кровь или плазму крови, взятые у субъекта. В дополнительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" означает ткань печени (или ее составляющие компоненты) или ткань сетчатки (или ее составляющие компоненты), полученные от субъекта.

## II. iRNA по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении предусмотрены iRNA, которые ингибируют экспрессию гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (т.е. гена KLKB1, гена F12 или гена KNG1). В одном варианте осуществления средство на основе iRNA предусматривает молекулы двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, в клетке, такой как клетка субъекта, например, млекопитающего, такого как человек, с заболеванием, ассоциированным с контактным путем активации свертывания крови, например, тромбофилией или наследственным ангионевротическим отеком или с риском развития заболевания, ассоциированного с контактным путем активации свертывания крови, например, тромбофилии, или возникновения приступа ангионевротического отека. dsRNA содержит антисмысловую нить, имеющую участок комплементарности, который комплементарен по меньшей мере части мРНК, образующейся при экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови. Длина участка комплементарности составляет приблизительно 30 нуклеотидов или меньше (например, длина составляет приблизительно 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19 или 18 нуклеотидов или меньше). При контакте с клеткой, экспрессирующей ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, iRNA ингибирует экспрессию гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (например, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови гена человека, примата, отличного от примата животного или птицы) по меньшей мере на приблизительно 10%, что установлено с помощью анализа, например, с помощью ПЦР, или способа с гибридизации ДНК с использованием разветвленных зондов (bDNA), или с помощью способа на основе анализа белков, как, например, с помощью иммунофлуоресцентного анализа с использованием, например, методик вестерн-блоттинга или проточной цитометрии.

dsRNA содержит две нити РНК, которые являются комплементарными и гибридизируются с образованием дуплексной структуры при условиях, в которых dsRNA будет применяться. Одна нить dsRNA (антисмысловая нить) содержит участок комплементарности, который практически комплементарен обычно полностью комплементарен целевой последовательности. Целевую последовательность можно получить из последовательности мРНК, образующейся в процессе экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (т.е. гена KLKB1, гена F12 или гена KNG1). Другая нить (смысловая нить) содержит участок, который комплементарен антисмысловой нити таким образом, что две нити гибридизируются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. Как описано в другом месте в данном документе и как известно в данной области, комплементарные последовательности dsRNA также могут содержаться в виде самокомплементарных участков одной молекулы нуклеиновой кислоты, а не располагаться на отдельных олигонуклеотидах.

Как правило, длина дуплексной структуры составляет от 15 до 30 пар оснований, например, длина составляет 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, или 21-22 пар оснований. Значения диапазона и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше значениям диапазона и длины, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Аналогично длина участка комплементарности для целевой последовательности составляет от 15 до 30 нуклеотидов, например, длина составляет 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, или 21-22 нуклеотида. Значения диапазона и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше значениям диапазона и длины, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

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

Специалисту в данной области также будет понятно, что дуплексный участок представляет собой основную функциональную часть dsRNA, например, дуплексный участок из приблизительно 9-36 пар оснований, например, из приблизительно 10-36, 11-36, 12-36, 13-36, 14-36, 15-36, 9-35, 10-35, 11-35, 12-35, 13-35, 14-35, 15-35, 9-34, 10-34, 11-34, 12-34, 13-34, 14-34, 15-34, 9-33, 10-33, 11-33, 12-33, 13-33, 14-33, 15-33, 9-32, 10-32, 11-32, 12-32, 13-32, 14-32, 15-32, 9-31, 10-31, 11-31, 12-31, 13-32, 14-31, 15-31, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, или 21-22 пар оснований. Таким образом, в одном варианте осуществления в той степени, в которой они становятся процессированными до функционального дуплекса из, например, 15-30 пар оснований, который целенаправленно воздействует на требуемую РНК для расщепления, молекула РНК или комплекс молекул РНК, имеющие дуплексный участок размером более 30 пар оснований, представляют собой dsRNA. Таким образом, специалисту в данной области будет понятно, что в одном варианте осуществления miRNA представляет собой dsRNA. В другом варианте осуществления dsRNA представляет собой не встречающуюся в природе miRNA. В другом варианте осуществления средство на основе iRNA, применимое для целенаправленного воздействия на экспрессию гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, не образуется в целевой клетке при расщеплении более крупной dsRNA.

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

dsRNA можно синтезировать с помощью стандартных способов, известных в данной области, дополнительно обсуждаемых ниже, например, с применением автоматического синтезатора ДНК, такого как коммерчески доступный от, например, Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

Соединения на основе iRNA по настоящему изобретению можно получать с применением двухстадийной процедуры. Во-первых, отдельные нити молекулы двухнитевой РНК получают раздельно. Затем составляющие нити отжигают. Отдельные нити соединения на основе siRNA можно получать с применением жидкофазного или твердофазного органического синтеза или их обоих. Органический синтез дает преимущество в том, что можно легко получать олигонуклеотидные нити, содержащие не встречающиеся в природе или модифицированные нуклеотиды. Однонитевые олигонуклеотиды по настоящему изобретению можно получать с применением жидкофазного или твердофазного органического синтеза или их обоих.

В одном аспекте dsRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность. Смысловая нить выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из табл. 3, 4, 9, 10, 15, 16, 19A, 19B, 19C, 19D, 19E, 19F, 20, 21, 23, 24, 26 и 27, и соответствующая смысловой нити антисмысловая нить выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из табл. 3, 4, 9, 10, 15, 16, 19A, 19B, 19C, 19D, 19E, 19F, 20, 21, 23, 24, 26 и 27.

В одном варианте осуществления смысловая нить выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из табл. 3, 4, 19A, и 19B, и соответствующая смысловой нити антисмысловая нить выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из табл. 3, 4, 19A и 19B. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, при этом одна из последовательностей практически комплементарна последовательности мРНК, образующейся при экспрессии гена KLKB1. В связи с этим в данном аспекте dsRNA будет содержать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описан как смысловая нить в любой из табл. 3, 4, 19A и 19B, а второй олигонуклеотид описан как соответствующая смысловой нити антисмысловая нить в какой-либо из табл. 3, 4, 19A и 19B. В одном варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся в отдельных олигонуклеотидах. В другом варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся в одном олигонуклеотиде.

В одном варианте осуществления смысловая нить выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из табл. 9, 10, 19C, 19D, 20, 21, 23, 24, 26 и 27, и соответствующая смысловой нити антисмысловая нить выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из табл. 9, 10, 19C, 19D, 20, 21, 23, 24, 26 и 27. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, при этом одна из последовательностей практически комплементарна последовательности мРНК, образующейся при экспрессии гена F12. В связи с этим в данном аспекте dsRNA будет содержать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описан как смысловая нить в любой из табл. 9, 10, 19C, 19D, 20, 21, 23, 24, 26 и 27, а второй олигонуклеотид описан как соответствующая смысловой нити антисмысловая нить в любой из табл. 9, 10, 19C, 19D, 20, 21, 23, 24, 26 и 27. В одном варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся в отдельных олигонуклеотидах. В другом варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся в одном олигонуклеотиде.

В одном варианте осуществления смысловая нить выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из табл. 15, 16, 19E и 19F, и соответствующая смысловой нити антисмысловая нить выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из табл. 15, 16, 19E и 19F. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, при этом одна из последовательностей практически комплементарна последовательности мРНК, образующейся при экспрессии гена KNG1. В связи с этим в данном аспекте dsRNA будет содержать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описан как смысловая нить в любой из табл. 15, 16, 19E и 19F, а второй олигонуклеотид описан как соответствующая смысловой нити антисмысловая нить в какой-либо из табл. 15, 16, 19E и 19F. В одном варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся в отдельных олигонуклеотидах. В другом варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся в одном олигонуклеотиде.

Будет понятно, что хотя некоторые из последовательностей в табл. 3, 4, 9, 10, 15, 16, 19A, 19B, 19C, 19D, 19E, 19F, 20, 21, 23, 24, 26 и 27 описаны как модифицированные и/или конъюгированные последовательности, РНК из числа iRNA по настоящему изобретению, например dsRNA по настоящему изобретению, может содержать любую из последовательностей, изложенных в табл. 3, 4, 9, 10, 15, 16, 19A, 19B, 19C, 19D, 19E, 19F, 20, 21, 23, 24, 26 и 27, которая является немодифицированной, неконъюгированной, и/или модифицированной, и/или конъюгированной иным образом, чем описано в них.

Специалисту в данной области хорошо известно, что dsRNA с дуплексной структурой из от приблизительно 20 до приблизительно 23 пар оснований, например из 21 пары оснований, были расценены как особенно эффективные в отношении индукции РНК-интерференции (Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888). Тем не менее, другие авторы обнаружили, что более короткие или более длинные дуплексные структуры РНК также могут быть эффективными (Chu and Rana (2007) RNA 14:1714-1719;

Kim et al. (2005) *Nat Biotech* 23:222-226). В вышеописанных вариантах осуществления в соответствии с природой олигонуклеотидных последовательностей, приведенных в любой из табл. 3, 4, 9, 10, 15, 16, 19A, 19B, 19C, 19D, 19E, 19F, 20, 21, 23, 24, 26 и 27, dsRNA, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере одну нить, длина которой составляет минимально 21 нуклеотид. С достаточной вероятностью можно предположить, что более короткие дуплексы с одной из последовательностей из любой из табл. 3, 4, 9, 10, 15, 16, 19A, 19B, 19C, 19D, 19E, 19F, 20, 21, 23, 24, 26 и 27, за исключением лишь нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, могут быть эффективными, аналогично описанным выше dsRNA. Следовательно, dsRNA с последовательностью по меньшей мере из 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше смежных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей в любой из табл. 3, 4, 19A и 19B, и отличающиеся по своей способности ингибировать экспрессию гена *KLKB1* не более чем на приблизительно 5, 10, 15, 20, 25 или 30% ингибирования от dsRNA, содержащей полную последовательность, dsRNA с последовательностью по меньшей мере из 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше смежных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей в любой из табл. 9, 10, 19C, 19D, 20 и 21, и отличающиеся по своей способности ингибировать экспрессию гена *F12* не более чем на приблизительно 5, 10, 15, 20, 25 или 30% ингибирования от dsRNA, содержащей полную последовательность, и dsRNA с последовательностью по меньшей мере из 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше смежных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей в любой из табл. 15, 16, 19E, и 19F, и отличающиеся по своей способности ингибировать экспрессию гена *KNG1* не более чем на приблизительно 5, 10, 15, 20, 25 или 30% ингибирования от dsRNA, содержащей полную последовательность, рассматриваются как находящиеся в пределах объема настоящего изобретения.

Кроме того, RNA, представленные в любой из табл. 3, 4, 19A и 19B, идентифицируют сайт(сайты) в транскрипте *KLKB1*, которые являются чувствительными к опосредованному RISC расщеплению, RNA, представленные в любой из табл. 9, 10, 19C, 19D, 20, 21, 23, 24, 26 и 27, идентифицируют сайт (сайты) в транскрипте *F12*, которые являются чувствительными к опосредованному RISC расщеплению, и RNA, представленные в любой из табл. 15, 16, 19E и 19F, идентифицируют сайт(сайты) в транскрипте *KNG1*, которые являются чувствительными к опосредованному RISC расщеплению. Таким образом, в настоящем изобретении дополнительно представлены iRNA, которые целенаправленно воздействуют на один из этих сайтов. Применимо к данному документу говорят, что iRNA целенаправленно воздействует на конкретный сайт РНК-транскрипта, если iRNA способствует расщеплению транскрипта в любом месте этого конкретного сайта. Такая iRNA будет, как правило, содержать по меньшей мере приблизительно 15 смежных нуклеотидов из одной из последовательностей, представленных в любой из табл. 3, 4, 9, 10, 15, 16, 19A, 19B, 19C, 19D, 19E, 19F, 20, 21, 23, 24, 26 и 27, соединенных с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из участка, смежного с выбранной последовательностью в гене, вовлеченном в контактный путь активации свертывания крови.

При том что длина целевой последовательности, как правило, составляет приблизительно 15-30 нуклеотидов, существует широкий спектр пригодности конкретных последовательностей в этом диапазоне для управления расщеплением любой заданной целевой РНК. Различные пакеты программного обеспечения и принципы, изложенные в данном документе, предоставляют руководство по идентификации оптимальных целевых последовательностей для любого данного гена-мишени, но также можно принять эмпирический подход, в котором "окно" или "маска" данного размера (в качестве неограничивающего примера 21 нуклеотид) буквально или фигурально (в том числе, например, *in silico*), размещены на последовательности целевой РНК для идентификации последовательностей в диапазоне размеров, которые могут служить в качестве целевых последовательностей. Постепенно перемещая "окно" последовательности на один нуклеотид выше или ниже исходного положения целевой последовательности, можно идентифицировать следующую потенциальную целевую последовательность, пока не будет идентифицирован полный набор возможных последовательностей для любого заданного выбранного целевого размера. С помощью этого способа в сочетании с системным синтезом и тестированием идентифицированных последовательностей (с применением анализов, описанных в данном документе или известных в данной области) для идентификации последовательностей с оптимальными характеристиками можно идентифицировать те последовательности РНК, которые при нацеливании со средством на основе iRNA опосредуют наилучшее ингибирование экспрессии целевого гена. Таким образом, при том, что идентифицированные последовательности, например, в любой из табл. 3, 4, 9, 10, 15, 16, 19A, 19B, 19C, 19D, 19E, 19F, 20, 21, 23, 24, 26 и 27, представляют собой эффективные целевые последовательности, предполагается, что дополнительная оптимизация эффективности ингибирования может быть достигнута путем постепенного "перемещения окна" на один нуклеотид выше или ниже относительно заданных последовательностей для идентификации последовательностей с такими же или лучшими характеристиками ингибирования.

Кроме того, также предполагается, что для любой идентифицированной последовательности, например, в любой из табл. 3, 4, 9, 10, 15, 16, 19A, 19B, 19C, 19D, 19E, 19F, 20, 21, 23, 24, 26 и 27, дополнительная оптимизация может быть достигнута путем систематического или добавления, или удаления нуклеотидов с получением более длинных или более коротких последовательностей и тестирования этих последовательностей, полученных путем перемещения окна, более длинного или более короткого по

размеру, выше или ниже относительно целевой РНК в данной точке. Также результатом объединения этого подхода для получения новых мишеней-кандидатов вместе с тестированием эффективности iRNA на основе этих целевых последовательностей в анализе ингибирования, известном в данной области или описанном в данном документе, могут быть дополнительные улучшения в эффективности ингибирования. Более того, такие оптимизированные последовательности можно корректировать, например, посредством введения модифицированных нуклеотидов, описанных в данном документе или известных из уровня техники, добавления или изменений выступающего конца или других модификаций, известных из уровня техники и/или описанных в данном документе, для дополнительной оптимизации молекулы (например, для повышения стабильности в сыворотке крови или периода полужизни в кровотоке, повышения термостабильности, улучшения трансмембранной доставки, нацеливания на конкретное местоположение или тип клеток, повышения степени взаимодействия с ферментами пути сайленсинга, повышения высвобождения из эндосом) в качестве ингибитора экспрессии.

iRNA, как описано в данном документе, может содержать одну или несколько ошибок спаривания с целевой последовательностью. В одном варианте осуществления iRNA, описанная в данном документе, содержит не более 3 ошибок спаривания. Если бессмысловая нить iRNA содержит ошибки спаривания с целевой последовательностью, предпочтительно, чтобы область ошибочного спаривания находилась не в центре участка комплементарности. Если бессмысловая нить iRNA содержит ошибки спаривания с целевой последовательностью, предпочтительно, чтобы ошибка спаривания была ограничена в пределах последних 5 нуклеотидов либо от 5'-, либо от 3'-конца участка комплементарности. Например, в случае средства на основе iRNA из 23 нуклеотидов нить, комплементарная участку гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, обычно не содержит какой-либо ошибки спаривания в пределах центральных 13 нуклеотидов. Способы, описанные в данном документе, или способы, известные из уровня техники, можно применять для определения того, является ли iRNA, содержащая ошибку спаривания с целевой последовательностью, эффективной в ингибировании экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови. Рассмотрение эффективности iRNA с ошибками спаривания при ингибировании экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, является важным, особенно, если известно, что конкретный участок комплементарности в гене, вовлеченном в контактный путь активации свертывания крови, характеризуется вариативностью полиморфных последовательностей в популяции.

### III. Модифицированные iRNA по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления РНК из числа iRNA по настоящему изобретению, например dsRNA, является немодифицированной и не содержит, например, химические модификации и/или конъюгации, известные в данной области и описанные в данном документе. В другом варианте осуществления РНК из числа iRNA по настоящему изобретению, например dsRNA, является химически модифицированной с целью улучшения стабильности или других полезных характеристик. В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению практически все из нуклеотидов iRNA по настоящему изобретению являются модифицированными. В других вариантах осуществления по настоящему изобретению все нуклеотиды в iRNA по настоящему изобретению являются модифицированными. iRNA по настоящему изобретению, в которых "практически все нуклеотиды являются модифицированными", являются в значительной степени, но не полностью модифицированными и могут содержать не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления практически все нуклеотиды iRNA по настоящему изобретению являются модифицированными, и при этом iRNA содержит не более 8 2'-фтор-модификаций (например, не более 7 2'-фтор-модификаций, не более 6 2'-фтор-модификаций, не более 5 2'-фтор модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций, не более 3 2'-фтор-модификаций или не более 2 2'-фтор-модификаций) в смысловой нити и не более 6 2'-фтор-модификаций (например, не более 5 2'-фтор-модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций, не более 3 2'-фтор-модификаций или не более 2 2'-фтор-модификаций) в бессмысловой нити. В других вариантах осуществления все нуклеотиды iRNA по настоящему изобретению являются модифицированными, и при этом iRNA содержит не более 8 2'-фтор-модификаций (например, не более 7 2'-фтор-модификаций, не более 6 2'-фтор-модификаций, не более 5 2'-фтор модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций, не более 3 2'-фтор-модификаций или не более 2 2'-фтор-модификаций) в смысловой нити и не более 6 2'-фтор-модификаций (например, не более 5 2'-фтор-модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций, не более 3 2'-фтор-модификаций или не более 2 2'-фтор-модификаций) в бессмысловой нити.

Нуклеиновые кислоты, представленные в настоящем изобретении, могут быть синтезированы и/или модифицированы способами, хорошо известными в данной области техники, такими как описанные в "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, который настоящим включен в данный документ посредством ссылки. Модификации предусматривают, например, концевые модификации, например, модификации 5'-конца (фосфорилирование, конъюгирование, инвертированные связи) или модификации 3'-конца (конъюгирование, нуклеотиды ДНК, инвертированные связи и т.д.); модификации оснований, например, замену стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые образуют пару оснований с расширенным репертуаром партнеров, удаление оснований (нуклеотиды с удаленным азотистым основа-

нием) или конъюгирование оснований; модификации Сахаров (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замену сахара и/или модификации остова, в том числе модификацию или замену фосфодифирных связей. Конкретные примеры соединений на основе iRNA, применимых в описанных в данном документе вариантах осуществления, включают без ограничения РНК, содержащие модифицированные остовы или не встречающиеся в природе межнуклеозидные связи. РНК с модифицированными остовами включают, среди прочего, такие, которые не содержат атом фосфора в остове. Для целей данного описания и как иногда упоминается в данной области модифицированные РНК, не содержащие атом фосфора в своем межнуклеозидном остове, также могут считаться олигонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления модифицированная iRNA будет содержать атом фосфора в своем межнуклеозидном остове.

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

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения вышеуказанных фосфорсодержащих связей, включают без ограничения патенты США №

3, 687, 808; 4, 469, 863; 4, 476, 301;  
 5, 023, 243; 5, 177, 195; 5, 188, 897; 5, 264, 423; 5, 276, 019;  
 5, 278, 302; 5, 286, 717; 5, 321, 131; 5, 399, 676; 5, 405, 939;  
 5, 453, 496; 5, 455, 233; 5, 466, 677; 5, 476, 925; 5, 519, 126;  
 5, 536, 821; 5, 541, 316; 5, 550, 111; 5, 563, 253; 5, 571, 799;  
 5, 587, 361; 5, 625, 050; 6, 028, 188; 6, 124, 445; 6, 160, 109;  
 6, 169, 170; 6, 172, 209; 6, 239, 265; 6, 277, 603; 6, 326, 199;  
 6, 346, 614; 6, 444, 423; 6, 531, 590; 6, 534, 639; 6, 608, 035;  
 6, 683, 167; 6, 858, 715; 6, 867, 294; 6, 878, 805; 7, 015, 315;  
 7, 041, 816; 7, 273, 933; 7, 321, 029;

и патент США RE39464, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Модифицированные остовы РНК, которые не содержат атом фосфора в своем составе, представляют собой остовы, образованные короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомными и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями или одной или несколькими короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. Они включают остовы с морфолиновыми связями (частично образованные из сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы; алкенсодержащие остовы; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленимидриновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы и другие, содержащие смесь составляющих частей N, O, S и CH<sub>2</sub>.

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения вышеупомянутых олигонуклеозидов, включают без ограничения патенты США №

5034506; 5166315; 5185444; 5214134;  
 5216141; 5235033; 564562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677;  
 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5608046;  
 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437 и 5677439,

полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

В других вариантах осуществления рассматриваются подходящие миметики РНК для применения в iRNA, в которых как сахар, так и межнуклеозидная связь, т.е. остов нуклеотидных звеньев, заменены новыми группами. Структурные единицы в виде оснований сохраняются для гибридизации с соответствующим целевым соединением нуклеиновой кислоты. Одно такое олигомерное соединение, миметик РНК, который, как было показано, обладает превосходными свойствами гибридизации, называется пептидной нуклеиновой кислотой (PNA). В соединениях PNA сахарный остов РНК заменен амидсодержащим остовом, в частности аминокислотным остовом. Нуклеотидные основания сохраняются и связываются непосредственно или опосредованно с атомами азота азатрупа амидной части остова. Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения соединений PNA, включают без ограни-

чения патенты США № 5539082; 5714331 и 5719262, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки. Дополнительные соединения PNA, подходящие для применения в iRNA по настоящему изобретению, описаны, например, в Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления, представленные в настоящем изобретении, включают РНК с фосфоротиоатными остовами и олигонуклеозиды с остовами с гетероатомами и, в частности,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$  [известный как метилен (метилиминный) или MMI остов],  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$  и  $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  [где нативный фосфодиэфирный остов представлен как  $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$ ] согласно вышеупомянутому патенту США № 5489677 и амидные остовы согласно вышеупомянутому патенту США № 5602240. В некоторых вариантах осуществления РНК, представленные в данном документе, имеют морфолиновые структуры остова согласно вышеупомянутому патенту США № 5034506.

Модифицированные РНК также могут содержать один или несколько замещенных сахарных фрагментов. iRNA, например dsRNA, представленные в данном документе, могут содержать одно из следующего в 2'-положении: OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут быть замещенными или незамещенными  $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилом или  $\text{C}_2-\text{C}_{10}$ алкенилом и алкинилом. Иллюстративные подходящие модификации включают  $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$  и  $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ , где n и m составляют от 1 до приблизительно 10. В других вариантах осуществления dsRNA содержат одно из следующего в 2'-положении: низший  $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH,  $\text{SCH}_3$ , OCN, Cl, Br, CN,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{OCF}_3$ ,  $\text{SOCH}_3$ ,  $\text{SO}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{ONO}_2$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_3$ ,  $\text{NH}_2$ , гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминоалкиламино, полиалкиламино, замещенный силлил, расщепляющую РНК группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств iRNA или группу для улучшения фармакодинамических свойств iRNA и другие заместители с аналогичными свойствами. В некоторых вариантах осуществления модификация предусматривает 2'-метоксиэтокси (2'-O- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ , также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504), т.е. алкокси-алкоксигруппу. Другой иллюстративной модификацией является 2'-диметиламинооксиэтокси, т.е. группа  $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$ , также известная как 2'-DMAOE, описанная в примерах в данном документе ниже, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известная в уровне техники как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), т.е. 2'-O- $\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ .

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH<sub>3</sub>), 2'-аминопропокси (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) и 2'-фтор (2'-F). Подобные модификации также могут быть осуществлены в других положениях в РНК из числа iRNA, в частности в 3'-положении сахара в 3'-концевом нуклеотиде или в dsRNA с 2'-5'-связями и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. iRNA также могут содержать миметики сахаров, такие как циклобутильные фрагменты, вместо пентофуранозильного сахара. Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения таких модифицированных сахарных структур, включают без ограничения патенты США №

4, 981, 957;

5, 118, 800;	5, 319, 080;	5, 359, 044;	5, 393, 878;	5, 446, 137;
5, 466, 786;	5, 514, 785;	5, 519, 134;	5, 567, 811;	5, 576, 427;
5, 591, 722;	5, 597, 909;	5, 610, 300;	5, 627, 053;	5, 639, 873;
5, 646, 265;	5, 658, 873;	5, 670, 633;	и 5, 700, 920,	

некоторые из которых имеют общего заявителя с настоящей заявкой. Полное содержание каждого из вышеупомянутых источников тем самым включено в данный документ посредством ссылки.

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

Дополнительные нуклеотидные основания включают такие, которые раскрыты в патенте США № 3687808, такие, которые раскрыты в Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; такие, которые раскрыты в The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J.L., ed. John Wiley & Sons, 1990, такие, которые раскры-

ты в Englisch et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613, и такие, которые раскрыты в Sanghvi, Y S., Chapter 15, *dsRNA Research and Applications*, pages 289-302, Crooke, S.T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из этих нуклеотидных оснований особенно применимы для повышения аффинности связывания олигомерных соединений, представленных в настоящем изобретении. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2-, N-6- и 0-6-замещенные пурины, в том числе 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что 5-метилцитозиновые замещения повышают стабильность дуплекса нуклеиновых кислот на 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., Eds., *dsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) и представляют собой иллюстративные замещения оснований, еще более конкретно в сочетании с 2'-О-метоксиэтиловыми модификациями сахаров.

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения некоторых из вышеуказанных модифицированных нуклеотидных оснований, а также других модифицированных нуклеотидных оснований, включают без ограничения вышеуказанные патенты США №

3, 687, 808, 4, 845, 205; 5, 130, 30; 5, 134, 066;  
 5, 175, 273; 5, 367, 066; 5, 432, 272; 5, 457, 187; 5, 459, 255;  
 5, 484, 908; 5, 502, 177; 5, 525, 711; 5, 552, 540; 5, 587, 469;  
 5, 594, 121, 5, 596, 091; 5, 614, 617; 5, 681, 941; 5, 750, 692;  
 6, 015, 886; 6, 147, 200; 6, 166, 197; 6, 222, 025; 6, 235, 887;  
 6, 380, 368; 6, 528, 640; 6, 639, 062; 6, 617, 438; 7, 045, 610;  
 7, 427, 672; и 7, 495, 088,

полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

РНК из числа iRNA также может быть модифицирована таким образом, чтобы она содержала один или несколько бициклических сахарных фрагментов. "Бициклический сахар" представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное путем формирования мостика между двумя атомами. "Бициклический нуклеозид" ("BNA") представляет собой нуклеозид с сахарным фрагментом, содержащим мостик, соединяющий два атома углерода сахарного кольца, образуя таким образом бициклическую кольцевую систему. В определенных вариантах осуществления мостик соединяет 4'-атом углерода и 2'-атом углерода в сахарном кольце. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления средство по настоящему изобретению может содержать одну или несколько запертых нуклеиновых кислот (LNA). Запертая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, содержащий модифицированный рибозный фрагмент, где рибозный фрагмент содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-атомы углерода. Другими словами, LNA представляет собой нуклеотид, содержащий бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'. Эта структура эффективно "запирает" рибозу в структурной конформации 3'-эндо. Было показано, что добавление запертых нуклеиновых кислот в siRNA повышает стабильность siRNA в сыворотке крови и снижает нецелевые эффекты (Elmen, J. et al. (2005) *Nucleic Acids Research* 33 (1): 439-447; Mook, O.R. et al. (2007) *Mol Canc Ther* 6 (3):833-843; Grunweller, A. et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 31 (12):3185-3193). Примеры бициклических нуклеозидов для применения в полинуклеотидах по настоящему изобретению включают без ограничения нуклеозиды, содержащие мостик между 4'-и 2'-атомами кольца рибозильного остатка. В определенных вариантах осуществления средства на основе антисмысловых полинуклеотидов по настоящему изобретению содержат один или несколько бициклических нуклеозидов, содержащих мостик 4'-2'. Примеры таких бициклических нуклеозидов с мостиком 4'-2' включают без ограничения 4'-(CH<sub>2</sub>)-O-2' (LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)-S-2'; 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2' (ENA); 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2' (также называемый "конформационно затрудненный этилом" или "cEt") и 4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 7399845); 4'-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278283); 4'-CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278425); 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-2' (см., например, публикацию патента США № 2004/0171570); 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>алкил или защитную группу (см., например, патент США № 7427672); 4'-CH<sub>2</sub>-C(H)(CH<sub>3</sub>)-2' (см., например, Chattopadhyaya et al., *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); и 4'-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278426). Полное содержание каждого из вышеупомянутых источников тем самым включено в данный документ посредством ссылки.

Дополнительные иллюстративные патенты США и публикации патентов США, в которых изложена идея получения нуклеотидов запертых нуклеиновых кислот, включают без ограничения следующие: патенты США №

6, 268, 490; 6, 525, 191; 6, 670, 461; 6, 770, 748;  
 6, 794, 499; 6, 998, 484; 7, 053, 207; 7, 034, 133; 7, 084, 125; 7, 399, 845;  
 7, 427, 672; 7, 569, 686; 7, 741, 457; 8, 022, 193; 8, 030, 467;  
 8, 278, 425; 8, 278, 426; 8, 278, 283; US 2008/0039618; и US  
 2009/0012281,

полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством

ссылки.

Какой-либо из вышеизложенных бициклических нуклеозидов можно получить с имеющим одну или несколько стереохимических конфигураций сахаров, в том числе, например,  $\alpha$ -L-рибофуранозой и  $\beta$ -D-рибофуранозой (см. WO 99/14226).

РНК из числа iRNA также может быть модифицирована таким образом, чтобы она содержала один или несколько затрудненных этилом нуклеотидов. Используемый в данном документе "затрудненный этилом нуклеотид" или "cEt" представляет собой запертую нуклеиновую кислоту, содержащую бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2'. В одном варианте осуществления затрудненный этилом нуклеотид находится в S-конформации, называемой в данном документе "S-cEt".

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

Иллюстративные публикации, в которых изложена идея получения некоторых из вышеуказанных CRN, включают без ограничения публикации патента США № 2013/0190383 и публикацию согласно PCT WO 2013/036868, полное содержание каждой из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

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

Иллюстративные публикации США, в которых изложена идея получения UNA, включают без ограничения патент США № 8314227 и публикации патентов США № 2013/0096289; 2013/0011922 и 2011/0313020, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

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

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

А. Модифицированные iRNA, содержащие мотивы по настоящему изобретению В некоторых аспектах настоящего изобретения двухнитевые средства для RNAi по настоящему изобретению включают средства с химическими модификациями, раскрытыми, например, в предварительной заявке на патент США № 61/561710, поданной 18 ноября 2011 г., или в PCT/US2012/065691, поданной 16 ноября 2012 г., полное содержание каждой из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Как показано в данном документе и в предварительной заявке № 61/561710 или в заявке согласно PCT/US2012/065691, превосходные результаты могут быть получены путем введения одного или нескольких мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в смысловую нить и/или антисмысловую нить средства для RNAi, в частности в сайт расщепления или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить средства для RNAi могут быть полностью модифицированы иным способом. Введение таких мотивов нарушает паттерн модификаций, если он имеется, смысловой и/или антисмысловой нити. Средство для RNAi, к примеру смысловая нить, может быть необязательно конъюгировано с лигандом, представляющим собой производное GalNAc. Полученные в результате средства для RNAi характеризуются превосходной активностью в отношении сайленсинга генов.

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

Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены двухнитевые средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию целевого гена (т.е. гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, т.е. гена KLKB1, гена F12 или гена KNG1) in vivo. Средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить. Длина каждой нити средства для RNAi может варьироваться от 12 до 30 нуклеотидов. Например, длина каждой нити может составлять 14-30 нуклеотидов, 17-30 нуклео-

тидов, 25-30 нуклеотидов, 27-30 нуклеотидов, 17-23 нуклеотида, 17-21 нуклеотид, 17-19 нуклеотидов, 19-25 нуклеотидов, 19-23 нуклеотида, 19-21 нуклеотид, 21-25 нуклеотидов или 21-23 нуклеотида.

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

В одном варианте осуществления средство для RNAi может содержать один или несколько выступающих участков и/или копирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах одной или обеих нитей. Длина выступающего конца может составлять 1-6 нуклеотидов, например 2-6 нуклеотидов, 1-5 нуклеотидов, 2-5 нуклеотидов, 1-4 нуклеотида, 2-4 нуклеотида, 1-3 нуклеотида, 2-3 нуклеотида или 1-2 нуклеотида. Наличие выступающих концов может быть обусловлено тем, что одна нить длиннее другой, или может быть обусловлено тем, что две нити одинаковой длины расположены со сдвигом. Выступающий конец может образовывать ошибочное спаривание с целевой мРНК или он может быть комплементарным целевым последовательностям генов или может иметь другую последовательность. Первая и вторая нити также могут быть соединены, например, дополнительными основаниями с образованием "шпильки" или при помощи других не содержащих основания линкеров.

В одном варианте осуществления каждый из нуклеотидов в участке выступающего конца средства для RNAi независимо может представлять собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, в том числе без ограничения с сахаром с 2'-модификацией, такой как 2'-F, 2'-O-метил, тимидин (Т), 2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин (Тео), 2'-O-метоксиэтиладенозин (Аео), 2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин (m5Ceo) и их любые комбинации. Например, последовательность выступающего конца на обоих концах каждой нити может представлять собой ТТ. Выступающий конец может образовывать ошибочное спаривание с целевой мРНК или он может быть комплементарным целевым последовательностям генов или может иметь другую последовательность.

5'- или 3'-выступающие концы смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей средства для RNAi могут быть фосфорилированными. В некоторых вариантах осуществления участок(участки) выступающего(выступающих) конца(концов) содержит(содержат) два нуклеотида с фосфоротиоатом между двумя нуклеотидами, при этом два нуклеотида могут быть одинаковыми или отличающимися. В одном варианте осуществления выступающий конец присутствует на 3'-конце смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей. В одном варианте осуществления этот 3'-выступающий конец присутствует в антисмысловой нити. В одном варианте осуществления этот 3'-выступающий конец присутствует в смысловой нити.

Средство для RNAi может содержать только один выступающий конец, который может повышать интерферирующую активность средства для RNAi без воздействия на его общую стабильность. Например, одонитевой выступающий конец может быть расположен на 3'-конце смысловой нити или в качестве альтернативы на 3'-конце антисмысловой нити. RNAi также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой нити (или 3'-конце смысловой нити) или vice versa. Как правило, антисмысловая нить RNAi имеет нуклеотидный выступающий конец на 3'-конце, а 5'-конец является тупым концом. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, предполагают, что асимметричный тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити и 3'-концевой выступающий конец антисмысловой нити способствуют включению направляющей нити в процесс с участием RISC.

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

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

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

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит смысловую нить из 21 нуклеотида и антисмысловую нить из 23 нуклеотидов, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца; анти-

смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца, где один конец средства для RNAi тупой, в то время как другой конец содержит выступ из 2 нуклеотидов. Предпочтительно выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити.

В тех случаях, когда выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити, между тремя концевыми нуклеотидами могут быть две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом, следующим за выступающим нуклеотидом. В одном варианте осуществления средство для RNAi дополнительно содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити. В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, представляет собой модифицированный нуклеотид. В одном варианте осуществления каждый остаток независимо модифицирован 2'-О-метилом или 3'-фтором, например, в чередующемся мотиве. Необязательно средство для RNAi дополнительно содержит лиганд (предпочтительно GalNAc<sub>3</sub>).

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

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит смысловую и антисмысловую нити, где средство для RNAi содержит первую нить, длина которой составляет по меньшей мере 25 и не более 29 нуклеотидов, и вторую нить, длина которой составляет не более 30 нуклеотидов, по меньшей мере с одним мотивом из трех 2'-О-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положении 11, 12, 13 от 5'-конца; где 3'-конец первой нити и 5'-конец второй нити образуют тупой конец, а вторая нить на своем 3'-конце на 1-4 нуклеотида длиннее, чем первая нить, где длина дуплексного участка составляет по меньшей мере 25 нуклеотидов, а вторая нить в достаточной степени комплементарна целевой мРНК на протяжении по меньшей мере 19 нуклеотидов длины второй нити, для снижения экспрессии целевого гена, где средство для RNAi вводят в клетку млекопитающего, и где расщепление средства для RNAi при помощи дайсера (Dicer) предпочтительно дает в результате siRNA, содержащую 3'-конец второй нити, за счет чего обеспечивается снижение экспрессии целевого гена у млекопитающего. Необязательно средство для RNAi дополнительно содержит лиганд.

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

В одном варианте осуществления антисмысловая нить средства для RNAi может также содержать по меньшей мере один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой нити или рядом с ним.

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

Смысловая нить средства для RNAi может содержать по меньшей мере один мотив из трех одина-

ковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления нити; а антисмысловая нить может иметь по меньшей мере один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления нити или рядом с ним. В тех случаях, когда смысловая нить и антисмысловая нить образуют дуплекс dsRNA, смысловая нить и антисмысловая нить могут быть выровнены так, что один мотив из трех нуклеотидов в смысловой нити и один мотив из трех нуклеотидов в антисмысловой нити имеют перекрытие по меньшей мере в один нуклеотид, т.е. по меньшей мере один из трех нуклеотидов мотива в смысловой нити образует пару оснований по меньшей мере с одним из трех нуклеотидов мотива в антисмысловой нити. В качестве альтернативы по меньшей мере два нуклеотида могут перекрываться или все три нуклеотида могут перекрываться.

В одном варианте осуществления смысловая нить средства для RNAi может содержать несколько мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов. Первый мотив может находиться в сайте расщепления нити или рядом с ним, а другие мотивы могут представлять собой фланкирующую модификацию. Термин "фланкирующая модификация" в данном документе относится к мотиву, находящемуся в другой части нити, который отделен от мотива в сайте расщепления той же нити или находится рядом с ним. Фланкирующая модификация либо прилегает к первому мотиву, либо отделена по меньшей мере одним или несколькими нуклеотидами. В тех случаях, когда мотивы непосредственно прилегают друг к другу, химическая структура мотивов отличается друг от друга, а если мотивы разделены одним или несколькими нуклеотидами, то химические структуры могут быть одинаковыми или разными. Могут присутствовать две или более фланкирующие модификации. Например, если присутствуют две фланкирующие модификации, то каждая фланкирующая модификация может встречаться на одном конце относительно первого мотива, который находится в сайте расщепления или рядом с ним, или с обеих сторон основного мотива.

Подобно смысловой нити, антисмысловая нить средства для RNAi может содержать несколько мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, при этом по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления нити или рядом с ним. Данная антисмысловая нить может также содержать одну или несколько фланкирующих модификаций, при выравнивании подобных фланкирующим модификациям, которые могут присутствовать в смысловой нити.

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

В другом варианте осуществления фланкирующая модификация в смысловой нити или антисмысловой нити средства для RNAi обычно не содержит первый один или первые два спаренных нуклеотида в дуплексном участке на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах нити.

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

В тех случаях, если каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит по меньшей мере две фланкирующие модификации, тогда смысловая нить и антисмысловая нить могут быть выровнены так, что две модификации, каждая от одной нити, попадают на один конец дуплексного участка с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации, каждая от одной нити, попадают на другой конец дуплексного участка с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации одной нити попадают по обе стороны от основного мотива с перекрытием в один, два или три нуклеотида в дуплексном участке.

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

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

жении концевой нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах нити, или может встречаться в двухнитевом и однонитевом участках, в частности на концах. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированными.

Это создает возможность, например, для повышения стабильности, для включения конкретных оснований в выступающие концы или для включения модифицированных нуклеотидов или имитаторов нуклеотидов в однонитевые выступающие концы, например, в 5'- или 3'-выступающий конец или в оба. Например, может быть желателен включить пуриновые нуклеотиды в выступающие концы. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые основания в 3'- или 5'-выступающем конце могут быть модифицированы, например, с помощью модификации, описанной в данном документе. Модификации могут предусматривать, например, применение модификаций в 2'-положении рибозного сахара с помощью модификаций, известных в данной области, например, применение дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезоксид-2'-фтор-(2'-F)- или 2'-О-метил-модификаций вместо рибозного сахара нуклеинового основания, а также модификаций фосфатной группы, например, фосфоротиоатных модификаций. Выступающие концы необязательно должны быть гомологичными целевой последовательности.

В одном варианте осуществления каждой остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован LNA, CRN, cET, UNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-дезоксид, 2'-гидроксидом или 2'-фтором. Нити могут содержать более одной модификации. В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью 2'-О-метила или 2'-фтора.

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

В одном варианте осуществления  $N_a$  и/или  $N_b$  содержат модификации чередующегося паттерна. Термин "чередующийся мотив", используемый в данном документе, относится к мотиву с одной или несколькими модификациями, при этом каждая модификация встречается у чередующихся нуклеотидов одной нити. Чередующийся нуклеотид может относиться к каждому второму нуклеотиду или к каждому третьему нуклеотиду или аналогичному паттерну. Например, если каждый из А, В и С представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся мотив может представлять собой

"АВАВАВАВАВАВ...", "ААВВААВВААВВ...", "ААВААВААВААВ...",

"ААВАААВАААВ...", "АААВВВАААВВВ..." или "АВСАВСАВСАВС..."

и т.д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или разным. Например, если каждый из А, В, С, D представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующиеся паттерны, т.е. модификации каждого второго нуклеотида, может быть одинаковым, но каждая из смысловой нити или антисмысловой нити может быть выбрана из нескольких возможных модификаций в чередующемся мотиве, как, например: "АВАВАВ...", "АСАСАС...", "ВДВДВД..." или "СДСДСД..." и т.д.

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

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

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

В одном варианте осуществления в тех случаях, когда мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов вводят в любую из нитей, модификация нуклеотида, следующего после мотива, является модификацией, отличной от модификации мотива. Например, часть последовательности, содержащей мотив, представляет собой "...N<sub>a</sub>Y<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>N<sub>b</sub>...", где "Y" представляет собой модификацию мотива из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, а "N<sub>a</sub>" и "N<sub>b</sub>" представляют собой модификацию нуклеотида, следующего после мотива "Y<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>", которая отличается от модификации Y, и где N<sub>a</sub> и N<sub>b</sub> могут быть одинаковыми или разными модификациями. В качестве альтернативы N<sub>a</sub> и/или N<sub>b</sub> могут присутствовать или отсутствовать в том случае, если присутствует фланкирующая модификация.

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

В одном варианте осуществления средство для RNAi имеет модификацию фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в участке выступающего конца. Например, участок выступающего конца может содержать два нуклеотида с фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью между двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также могут быть выполнены для соединения выступающих нуклеотидов с концевыми спаренными нуклеотидами в пределах дуплексного участка. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все выступающие нуклеотиды могут быть связаны посредством фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи и необязательно могут присутствовать дополнительные фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, соединяющие выступающий нуклеотид со спаренным нуклеотидом, после которого следует выступающий нуклеотид. Например, между тремя концевыми нуклеотидами могут присутствовать по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов представляют собой выступающие нуклеотиды, а третий является спаренным нуклеотидом, следующим после выступающего нуклеотида. Эти три концевые нуклеотиды могут быть на 3'-конце антисмысловой нити, 3'-конце смысловой нити, 5'-конце антисмысловой нити и/или 5'-конце антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления выступающий конец из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити и между тремя концевыми нуклеотидами присутствуют две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом, следующим после выступающего нуклеотида.

Необязательно средство для RNAi может дополнительно иметь две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит ошибочное(ошибочные) спаривание(спаривания) с мишенью, в дуплексе или их комбинации. Ошибочное спаривание может встречаться в участке выступающего конца или в дуплексном участке. Пары оснований можно выстраивать на основе их способности содействовать диссоциации или плавлению (например, по свободной энергии ассоциации или диссоциации определенного спаривания, при этом наиболее простым подходом является изучение пар по отдельности для каждой пары оснований, однако также можно использовать анализ ближайшего соседа или подобный). С точки зрения содействия диссоциации: A:U более предпочтительна, чем G:C; G:U более предпочтительна, чем G:C; а I:C более предпочтительна, чем G:C (I=инозин). Ошибочные спаривания, например неканонические или отличные от канонических типы спаривания (описанные в других частях данного документа), предпочтительнее канонических типов спаривания (A:T, A:U, G:C); и типы спаривания, которые включают универсальное основание, предпочтительнее канонических типов спаривания.

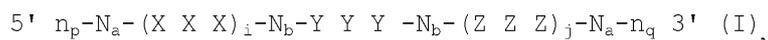
В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в дуплексных участках от 5'-конца антисмысловой нити, независимо выбранную из группы, состоящей из: A:U, G:U, I:C и ошибочно спаренных пар, например, неканонических, или отличных от канонических типов спаривания, или типов спаривания, которые включают универсальное

основание, для содействия диссоциации антисмысловой нити на 5'-конце дуплекса.

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

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

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



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

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

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

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

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

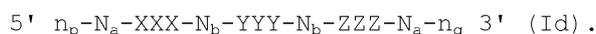
где  $N_b$  и  $Y$  имеют неодинаковую модификацию; и

каждый из XXX, YYY и ZZZ независимо представляет собой один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов. Предпочтительно в YYY все нуклеотиды 2'-F-модифицированы.

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

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

В одном варианте осуществления  $i$  равняется 1, а  $j$  равняется 0, или  $i$  равняется 0, а  $j$  равняется 1, или  $i$  и  $j$  равняются 1. Таким образом, смысловая нить может быть представлена следующими формулами:



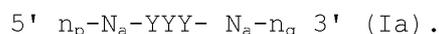
В тех случаях, когда смысловая нить представлена формулой (Ib), тогда  $N_b$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a$  независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую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

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

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

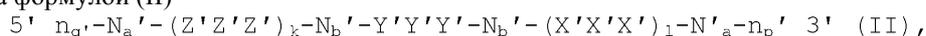
Каждый из X, Y и Z может быть одинаковым или отличным от остальных.

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



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

В одном варианте осуществления последовательность антисмысловой нити для RNAi может быть представлена формулой (II)



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

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

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

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

каждый  $n_p'$  и  $n_q'$  независимо представляют собой выступающий нуклеотид;

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

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

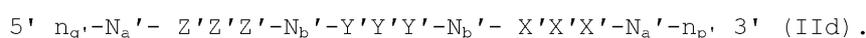
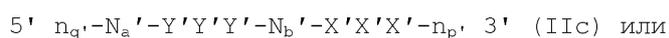
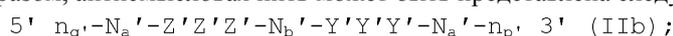
В одном варианте осуществления  $N_a'$  и/или  $N_b'$  содержит модификации чередующегося паттерна.

Мотив  $Y'Y'Y'$  находится в сайте расщепления антисмысловой нити или рядом с ним. Например, если средство для RNAi содержит дуплексный участок, длина которого составляет 17-23 нуклеотида, то мотив  $Y'Y'Y'$  может находиться в положениях 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14 или 13, 14, 15 антисмысловой нити, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца; или необязательно отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца. Предпочтительно мотив  $Y'Y'Y'$  находится в положениях 11, 12, 13.

В одном варианте осуществления в мотиве  $Y'Y'Y'$  все нуклеотиды 2'-ОМЕ-модифицированы.

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

Таким образом, антисмысловая нить может быть представлена следующими формулами:

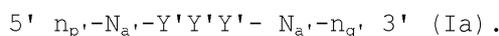


В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (IIb),  $N_b'$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность,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

В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (IIc),  $N_b'$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (II d), каждый  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно  $N_b'$  равняется 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

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



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

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

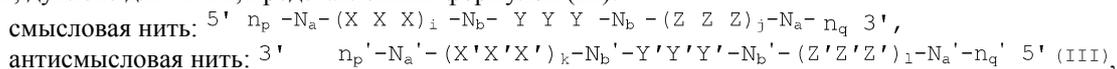
Каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити может быть независимо модифицирован LNA, CRN, UNA, cEt, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Например, каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором. Каждый X, Y, Z, X', Y' и Z', в частности, может представлять собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию.

В одном варианте осуществления смысловая нить средства для RNAi может содержать мотив YYY, находящийся в положениях 9, 10 и 11 нити, в тех случаях, когда дуплексный участок составляет 21 нуклеотид, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца, или необязательно отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца; и Y представляет собой 2'-F-модификацию. Смысловая нить может дополнительно содержать мотив XXX или мотивы ZZZ в качестве фланкирующих модификаций на противоположном конце дуплексного участка; и каждый из XXX и ZZZ независимо представляет собой 2'-ОМЕ-модификацию или 2'-F-модификацию.

В одном варианте осуществления антисмысловая нить может содержать мотив Y'Y'Y', находящийся в положениях 11, 12, 13 нити, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца, или необязательно отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца; и Y' представляет собой 2'-О-метил-модификацию. Антисмысловая нить может дополнительно содержать мотив X'X'X' или мотивы Z'Z'Z' в качестве фланкирующих модификаций на противоположном конце дуплексного участка; и каждый из X'X'X' и Z'Z'Z' независимо представляет собой 2'-Оме-модификацию или 2'-F-модификацию.

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

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



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

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

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

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

где каждый n<sub>p</sub>', n<sub>p</sub>, n<sub>q</sub>' и n<sub>q</sub>, каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; и

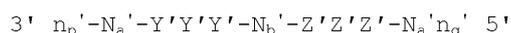
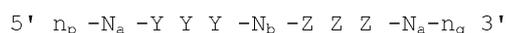
каждый из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов.

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

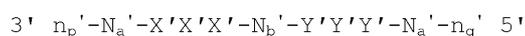
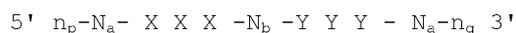
Иллюстративные комбинации смысловой нити и антисмысловой нити, образующих дуплекс для RNAi, включают формулы, приведенные ниже:



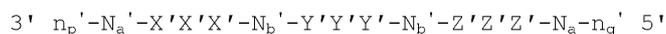
(IIIa),



(IIIb),



(IIIc),



(IIId).

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIa), каждый N<sub>a</sub> независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIb), каждый N<sub>b</sub> независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотида. Каждый N<sub>a</sub> независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIc), каждый N<sub>b</sub>, N<sub>b</sub>' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N<sub>a</sub> независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIId), каждый N<sub>b</sub>, N<sub>b</sub>' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N<sub>a</sub>, N<sub>a</sub>' независимо представляет собой олигонуклео-

тидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждый из  $N_a$ ,  $N_a'$ ,  $N_b$  и  $N_b'$  независимо содержит модификации чередующегося паттерна.

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

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

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

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

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

В одном варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIId), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации. В другом варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIId), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, и  $n_p > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи. В еще одном варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIId), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи, а смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера (описанного ниже). В другом варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIId), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь, и смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

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

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

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

В одном варианте осуществления два средства для RNAi, представленные формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIIId), соединены друг с другом на 5'-конце, и один или оба 3'-конца необязательно конъюгированы с лигандом. Каждое из средств может целенаправленно воздействовать на один и тот же ген или на два различных гена; или каждое из средств может целенаправленно воздействовать на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В различных публикациях описаны мультимерные средства для RNAi, которые можно применять в способах по настоящему изобретению. Такие публикации включают WO 2007/091269, патент США №

7858769, WO 2010/141511, WO 2007/117686, WO 2009/014887 и WO 2011/031520, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Как описано более подробно ниже, средство для RNAi, содержащее один или нескольких углеводных фрагментов, конъюгированных со средством для RNAi, может улучшать одно или несколько свойств средства для RNAi. Во многих случаях углеводный фрагмент будет присоединен к модифицированной субъединице средства для RNAi. Например, рибозный сахар одной или нескольких рибонуклеотидных субъединиц средства на основе dsRNA можно заменять другими фрагментами, например отличным от углевода (предпочтительно циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидную субъединицу, в которой рибозный сахар субъединицы был заменен таким образом, называют в данном документе субъединицей с модификацией путем замены рибозы (RRMS). Циклический носитель может быть карбоциклической кольцевой системой, т.е. все атомы в кольце являются атомами углерода, или гетероциклической кольцевой системой, т.е. один или несколько атомов в кольце могут быть гетероатомами, например, азотом, кислородом, серой. Циклический носитель может быть моноциклической кольцевой системой или может содержать два или более колец, например, конденсированных колец. Циклический носитель может представлять собой полностью насыщенную кольцевую систему или может содержать одну или несколько двойных связей.

Лиганд может быть присоединен к полинуклеотиду посредством носителя. Носители включают (i) по меньшей мере одну "точку присоединения к остову", предпочтительно две "точки присоединения к остову" и (ii) по меньшей мере одну "связывающую точку присоединения". "Точка присоединения к остову", используемая в данном документе, относится к функциональной группе, например гидроксильной группе, или, как правило, связи, доступной для встраивания носителя в остов, например фосфатный или модифицированный фосфатный, например серосодержащий, остов, и подходящей для этого рибонуклеиновой кислоты. "Связывающая точка присоединения" (TAP) в некоторых вариантах осуществления относится к входящему в состав кольца атому циклического носителя, например атому углерода или гетероатому (отличному от атома, который обеспечивает точку присоединения к остову), с которым связывается выбранный фрагмент. Фрагмент может быть, например, углеводом, например моносахаридом, дисахаридом, трисахаридом, тетрасахаридом, олигосахаридом и полисахаридом. Необязательно выбранный фрагмент присоединен посредством промежуточного связывающего фрагмента к циклическому носителю. Таким образом, циклический носитель во многих случаях будет включать функциональную группу, например, аминогруппу, или, как правило, обеспечивать связь, подходящую для введения или связывания другого химического структурного элемента, например лиганда, в состав кольца.

Средства для RNAi можно конъюгировать с лигандом через носитель, где носитель может быть циклической группой или ациклической группой; при этом предпочтительно циклическая группа выбрана из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]-диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина; предпочтительно ациклическая группа выбрана из остова, представляющего собой сериол, или остова, представляющего собой диэтанолламин.

В некоторых конкретных вариантах осуществления средство для RNAi для применения в способах по настоящему изобретению представляет собой средство, выбранное из группы средств, приведенных в любой из табл. 3, 4, 9, 10, 15, 16, 19A, 19B, 19C, 19D, 19E, 19F, 20, 21, 23, 24, 26 и 27. В одном варианте осуществления средство представляет собой любое из средств, приведенных в любой из табл. 9, 10, 19C, 19D, 20, 21, 23, 24, 26 и 27. Такие средства могут дополнительно содержать лиганд.

#### IV. iRNA, конъюгированные с лигандами.

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

В одном варианте осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или время существования средства на основе iRNA, в которое он встроен. В предпочтительных вариантах осуществления

лиганд обеспечивает повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, например молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, например клеточного компартмента или части органа, ткани, органа или участка тела, как, например, по сравнению с видами, у которых отсутствует такой лиганд. Предпочтительные лиганды не будут принимать участие в спаривании дуплекса в дуплексной нуклеиновой кислоте.

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

Лиганды также могут включать нацеливающие группы, например нацеливающее на клетку или ткань средство, например лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, например клеткой почки. Нацеливающей группой может быть тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, углевод муцин, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза, поливалентная фукоза, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентная галактоза, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчная кислота, фолат, витамин B12, витамин А, биотин, или RGD-пептид, или миметик RGD-пептида.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (ТРРС4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например холестерин, холевую кислоту, адмантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О-(гексадецил)глицерин, геранилосигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, О3-(олеоил)литохолевую кислоту, О3-(олеоил)холевую кислоту, диметокситритил или феноксазин и пептидные конъюгаты (например, пептид *antennapedia*, Tat-пептид), алкилирующие средства, фосфат, аминок, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]<sub>2</sub>, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченные радиоизотопами маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), вещества, способствующие транспорту/абсорбции (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, конъюгаты акридин-имидазол, комплекс Eu<sup>3+</sup> тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

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

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

В некоторых вариантах осуществления лиганд присоединен к iRNA, как описано в данном документе, и действует как фармакокинетический модулятор (PK-модулятор). PK-модуляторы включают липофилы, желчные кислоты, стероиды, фосфолипидные аналоги, пептиды, белок-связывающие средства, PEG, витамины и т.д. Иллюстративные PK-модуляторы включают без ограничения холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т.д. Олигонуклеотиды, которые содержат некоторое количество фосфоротиоатных связей, также, как известно, связываются с сывороточным белком, следовательно, короткие олигонуклеотиды, например олигонуклеотиды из приблизительно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие множество фосфоротиоатных связей в

остове, также пригодны в настоящем изобретении в качестве лигандов (например, в качестве РК-модулирующих лигандов). Кроме того, аптамеры, которые связываются сывороточными компонентами (например, сывороточными белками), также пригодны для применения в качестве РК-модулирующих лигандов в описанных в данном документе вариантах осуществления.

Конъюгированные с лигандами олигонуклеотиды по настоящему изобретению можно синтезировать с применением олигонуклеотида, который несет боковую реакционноспособную функциональную группу, как, например, полученного в результате присоединения связывающей молекулы к олигонуклеотиду (описано ниже). Этот реакционноспособный олигонуклеотид может вступать в реакцию с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезируют с наличием какой-либо из разнообразных защитных групп, или лигандами, которые имеют связывающий фрагмент, присоединенный к ним.

Олигонуклеотиды, применяемые в конъюгатах по настоящему изобретению, можно получать с помощью удобного и стандартного способа хорошо известного твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза реализуется несколькими фирмами-производителями, включая, например, Applied Biosystems (Фостер Сити, Калифорния). Дополнительно или альтернативно можно использовать любые другие средства для такого синтеза, известные в данной области. Также известно применение аналогичных методов для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфоротиоаты и алкилированные производные.

Конъюгированные с лигандом олигонуклеотиды и молекула-лиганд, несущая специфичные в отношении последовательности связанные нуклеозиды по настоящему изобретению, олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем синтезаторе ДНК с применением стандартных предшественников нуклеотида или нуклеозида, или предшественников конъюгатов с нуклеотидом или нуклеозидом, которые уже несут связывающий фрагмент, предшественников нуклеотида-лиганда или конъюгата с нуклеозидом, которые уже несут молекулу-лиганд, или структурных блоков, несущих лиганд, отличный от нуклеозида.

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

#### А. Конъюгаты с липидами.

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

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

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

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

В другом аспекте лигандом является фрагмент, например витамин, который поглощается целевой клеткой, например пролиферирующей клеткой. Он является особенно применимым для лечения нарушений, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например злокачественного или доброкачественного типа, например раковых клеток. Иллюстративные витамины включают витамины А, Е и К. Другие иллюстративные витамины включают витамины группы В, например, фолиевую кислоту, В12,

рибофлавин, биотин, пиридоксаль, или другие витамины, или нутриенты, поглощаемые целевыми клетками, например, клетками печени. Также включены HAS и липопротеин низкой плотности (LDL).

В. Средства, обеспечивающие проникновение в клетку.

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

Лигандом может быть пептид или пептидомиметик.

Пептидомиметик (также называемый в данном документе олигопептидомиметиком) является молекулой, способной укладываться в определенную трехмерную структуру, аналогичную природному пептиду. Присоединение пептида и пептидомиметиков к средствам на основе iRNA может повлиять на фармакокинетическое распределение iRNA, например путем повышения степени клеточного распознавания и абсорбции. Длина фрагмента пептида или пептидомиметика может составлять приблизительно 5-50 аминокислот, например, приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

Пептидом или пептидомиметиком может быть, например, пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий, главным образом, из Tug, Trp или Phe). Пептидным фрагментом может быть пептид-дендример, конформационно затрудненный пептид или перекрестно сшитый пептид. В другом альтернативном варианте пептидный фрагмент может включать гидрофобную последовательность, обеспечивающую перенос через мембрану (MTS). Иллюстративным содержащим гидрофобную MTS пептидом является RFGF с аминокислотной последовательностью AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 26). RFGF-аналог (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 27), содержащий гидрофобную MTS, также может быть нацеливающим фрагментом. Пептидный фрагмент может представлять собой "доставляющий" пептид, который может переносить большие полярные молекулы, в том числе пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны. Например, было обнаружено, что последовательности из Tat-белка HIV (GRKKRRQRRPPQ (SEQ ID NO: 28) и белка Antennapedia Drosophila (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 29) способны функционировать в качестве доставляющих пептидов. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться случайными последовательностями ДНК, как, например, пептид, идентифицированный в библиотеке фагового дисплея или комбинаторной библиотеке "одна гранула-одно соединение" (OBOC) (Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991). Примером пептида или пептидомиметика, связанного со средством на основе dsRNA посредством введенной мономерной единицы, является нацеливающий на клетку пептид, состоящий из аргинина-глицина-аспарагиновой кислоты (RGD), или RGD-миметик. Длина пептидного фрагмента может варьироваться от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут иметь структурную модификацию, как, например, для повышения стабильности или управления конформационными свойствами. Можно использовать любую из структурных модификаций, описанных ниже.

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

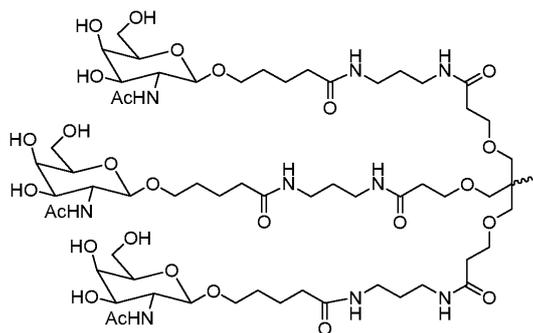
"Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку" способен проникать в клетку, например микробную клетку, такую как клетка бактерии или гриба, или в клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Пептидом, обеспечивающим проникновение в микробную клетку, например, может быть аспиральный линейный пептид (например, LL-37 или Ceropin P1), содержащий дисульфидную связь пептид (например,  $\alpha$ -дефензин,  $\beta$ -дефензин или бактенецин) или пептид, содержащий только одну или две преобладающие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, также может включать клеточный сигнал внутриядерной локализации (NLS). Например, пептидом, обеспечивающим проникновение в клетку, может быть двухкомпонентный амфипатический пептид, такой как MPG, который получен из домена пептида слияния gp41 HIV-1 и NLS из большого T-антигена SV40 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

С. Конъюгаты с углеводами.

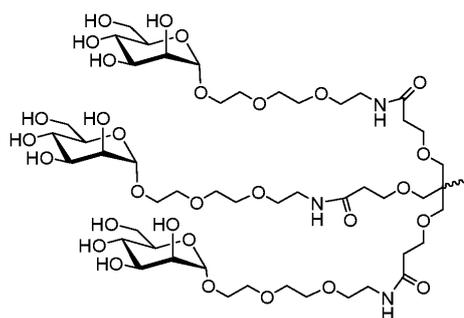
В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению предусматривается олигонуклеотид iRNA, дополнительно содержащий углевод. Конъюгированная с углеводом iRNA является предпочтительной для *in vivo* доставки нуклеиновых кислот, а также композиций, подходящих для *in vivo* терапевтического применения, описанного в данном документе. Используемый в данном документе термин "углевод" относится к соединению, которое представляет собой углевод *per se*,

образованный из одного или нескольких моносахаридных звеньев, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода; или к соединению, имеющему в качестве его части углеводный фрагмент, образованный из одного или нескольких моносахаридных звеньев, каждое из которых имеет по меньшей мере шесть атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Типичные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие приблизительно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных звеньев) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные смолы. Определенные моносахариды включают HBV и выше (например, HBV, C6, C7 или C8) сахара; ди- и трисахариды включают сахара с двумя или тремя моносахаридными звеньями (например, HBV, C6, C7 или C8).

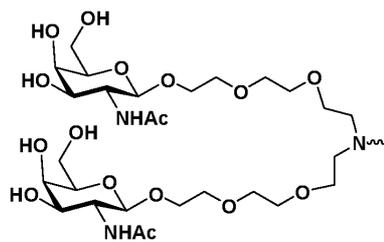
В одном варианте осуществления конъюгат с углеводом для применения в композициях и способах по настоящему изобретению представляет собой моносахарид. В другом варианте осуществления конъюгат с углеводом для применения в композициях и способах по настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из



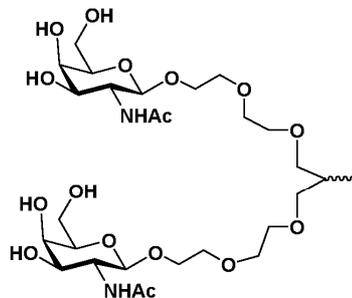
формула II,



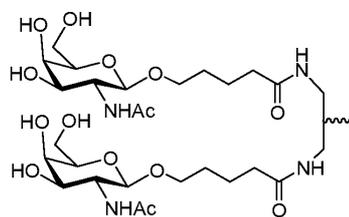
формула III,



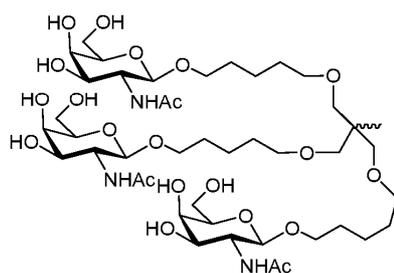
формула IV,



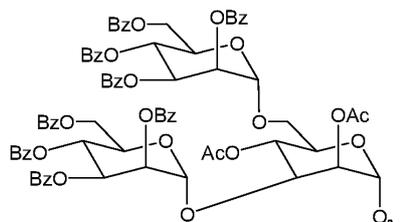
формула V,



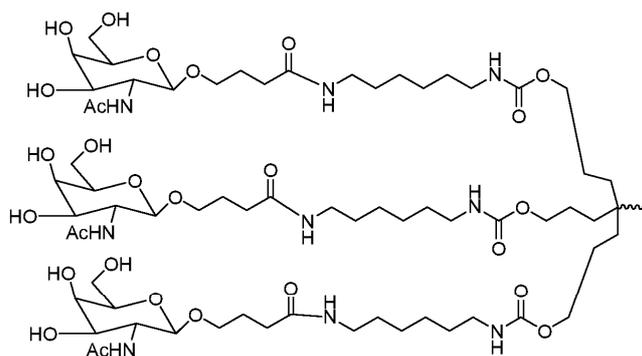
формула VI,



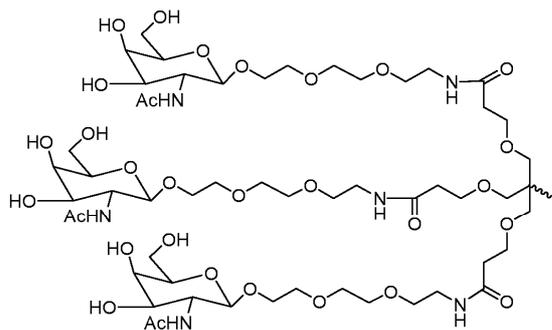
формула VII,



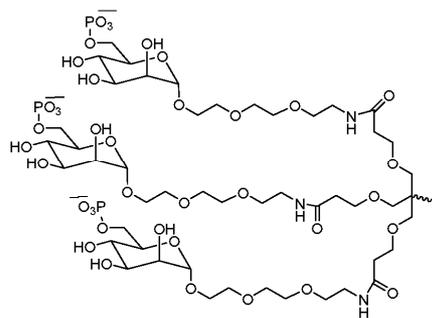
формула VIII,



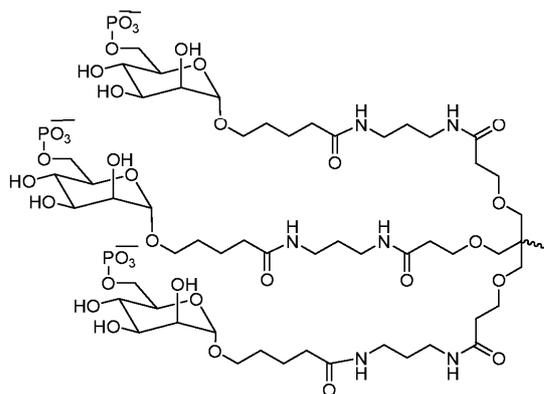
формула IX,



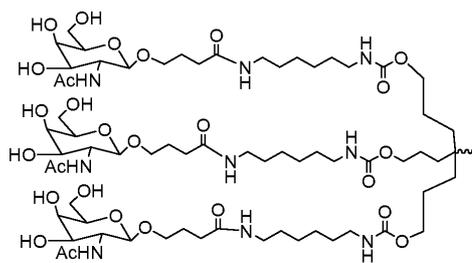
формула X,



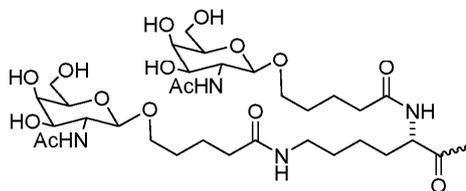
формула XI,



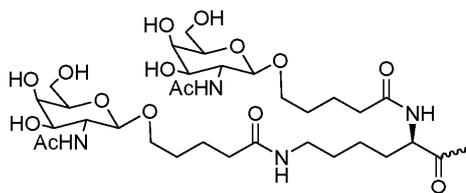
формула XII,



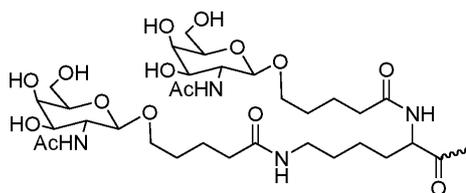
формула XIII,



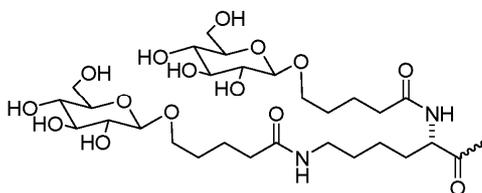
формула XIV,



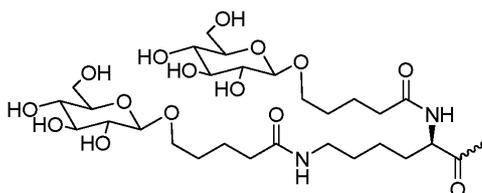
формула XV,



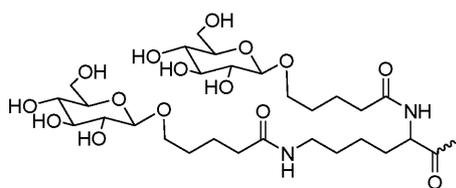
формула XVI,



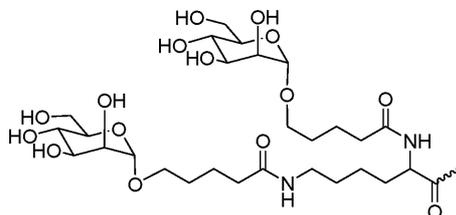
формула XVII,



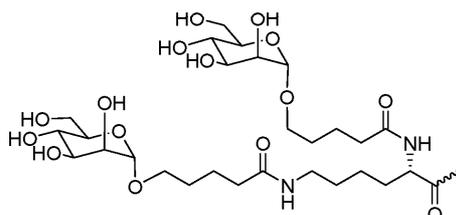
формула XVIII,



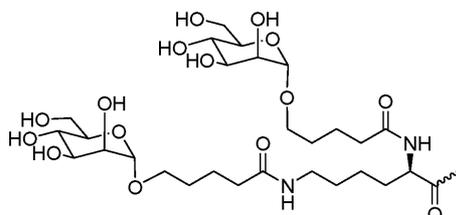
формула XIX,



формула XX,

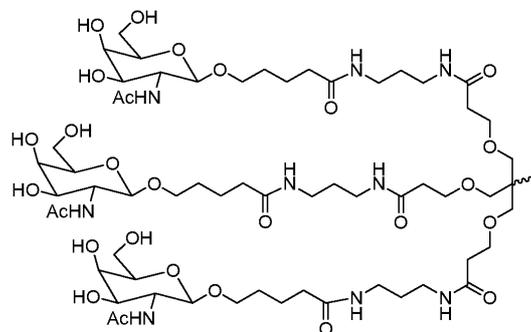


формула XXI,



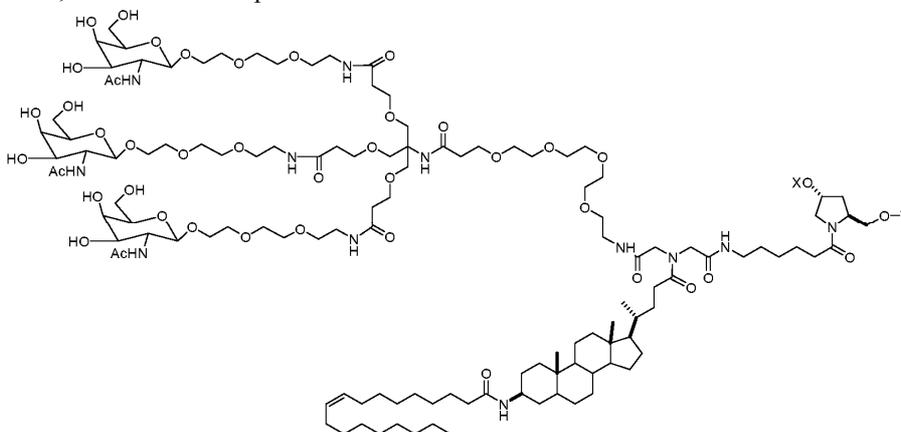
формула XXII.

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



формула II.

Другой типичный конъюгат с углеводом для применения в вариантах осуществления, описанных в данном документе, включает без ограничения



(формула XXIII), где один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, при этом другой представляет собой водород.



или которые не обладают специфичностью к субстратам, в том числе, например, окислительные или восстановительные ферменты или восстановительные средства, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать расщепляемую с помощью окислительно-восстановительных реакций линкерную группу путем восстановления; эстеразы; эндосомы или средства, которые могут создавать кислую среду, например, такие, которые приводят к значению рН, равному пяти или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушать расщепляемую кислотой линкерную группу, действуя в качестве универсальной кислоты, пептидазы (которые могут быть субстрат-специфичными) и фосфатазы.

Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть чувствительной к значению рН. Значение рН сыворотки крови человека составляет 7,4, в то время как среднее значение рН внутри клетки немного ниже и находится в диапазоне приблизительно 7,1-7,3. Эндосомы характеризуются более кислым значением рН в диапазоне 5,5-6,0, а лизосомы характеризуются еще более кислым значением рН, составляющим приблизительно 5,0. Некоторые линкеры будут иметь расщепляемую связывающую группу, которая расщепляется в условиях предпочтительного рН, высвобождая тем самым катионный липид из лиганда внутри клетки или в требуемый компартмент клетки.

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

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

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

i. Расщепляемые с помощью окислительно-восстановительных реакций линкерные группы.

В одном варианте осуществления расщепляемая линкерная группа представляет собой расщепляемую с помощью окислительно-восстановительных реакций связывающую группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером расщепляемой при восстановлении линкерной группы является дисульфидная линкерная группа (-S-S-). Для определения того, является ли кандидатная расщепляемая линкерная группа подходящей "расщепляемой при восстановлении линкерной группой" или, например, подходящей для применения с конкретным фрагментом iRNA и конкретным нацеливающим средством, можно обратиться к способам, описанным в данном документе. Например, кандидат может быть оценен путем инкубирования с дитиотреитолом (DTT) или другим восстанавливающим средством с применением реагентов, известных в данной области, которые имитируют скорость расщепления, которая наблюдалась бы в клетке, например, целевой клетке. Кандидаты также могут быть оценены в условиях, которые выбирают для имитации условий в крови или сыворотке крови. В одном варианте осуществления кандидатные соединения расщепляются не более чем на приблизительно 10% в крови. В других вариантах осуществления применимые кандидатные соединения разрушаются по меньшей мере в приблизительно 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или в приблизительно 100 раз быстрее в клетке (или в *in vitro* условиях, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или *in vitro* условиями, выбранными для имитации внеклеточных условий). Степень расщепления кандидатных соединений можно определить с помощью стандартных анализов ферментативной кинетики в условиях, выбранных для имитации внутриклеточной среды, и сравнить с условиями, выбранными для имитации внеклеточной среды.

ii. Фосфатные расщепляемые линкерные группы.

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит фосфатную расщепляемую линкерную группу. Фосфатная расщепляемая линкерная группа расщепляется средствами, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Примером средства, которое расщепляет фосфатные группы

в клетках, являются ферменты, такие как фосфатазы клетки. Примерами фосфатных линкерных групп являются  $-O-P(O)(ORk)-O-$ ,  $-O-P(S)(ORk)-O-$ ,  $-O-P(S)(SRk)-O-$ ,  $-S-P(O)(ORk)-O-$ ,  $-O-P(O)(ORk)-S-$ ,  $-S-P(O)(ORk)-S-$ ,  $-O-P(S)(ORk)-S-$ ,  $-S-P(S)(ORk)-O-$ ,  $-O-P(O)(Rk)-O-$ ,  $-O-P(S)(Rk)-O-$ ,  $-S-P(O)(Rk)-O-$ ,  $-S-P(S)(Rk)-O-$ ,  $-S-P(O)(Rk)-S-$ ,  $-O-P(S)(Rk)-S-$ . Предпочтительные варианты осуществления представляют собой  $-O-P(O)(OH)-O-$ ,  $-O-P(S)(OH)-O-$ ,  $-O-P(S)(SH)-O-$ ,  $-S-P(O)(OH)-O-$ ,  $-O-P(O)(OH)-S-$ ,  $-S-P(O)(OH)-S-$ ,  $-O-P(S)(OH)-S-$ ,  $-S-P(S)(OH)-O-$ ,  $-O-P(O)(H)-O-$ ,  $-O-P(S)(H)-O-$ ,  $-S-P(O)(H)-O-$ ,  $-S-P(S)(H)-O-$ ,  $-S-P(O)(H)-S-$ ,  $-O-P(S)(H)-S-$ . Предпочтительный вариант осуществления представляет собой  $-O-P(O)(OH)-O-$ . Эти кандидаты могут быть оценены с помощью способов, аналогичных описанным выше.

iii. Расщепляемые кислотой линкерные группы.

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

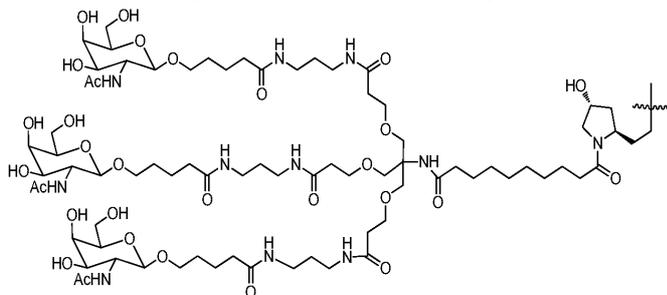
iv. Сложноэфирные линкерные группы.

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит сложноэфирную линкерную группу. Расщепляемая сложноэфирная линкерная группа расщепляется в клетках ферментами, такими как эстеразы и амидазы. Примеры сложноэфирных расщепляемых линкерных групп включают без ограничения сложные эфиры с алкиленовыми, алкениленовыми и алкиниленовыми группами. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой  $-C(O)O-$  или  $-OC(O)-$ . Эти кандидаты могут быть оценены с помощью способов, аналогичных описанным выше.

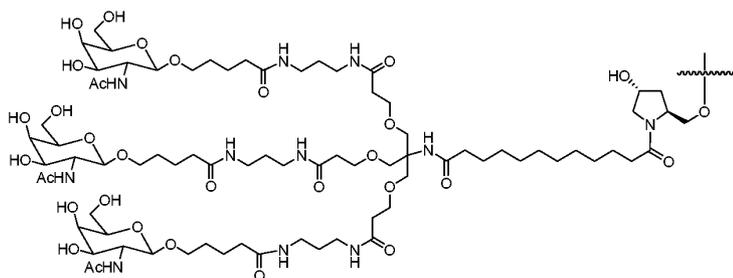
v. Пептидные расщепляемые группы.

В еще одном варианте осуществления расщепляемый линкер содержит пептидную расщепляемую группу. Пептидная расщепляемая линкерная группа расщепляется в клетках ферментами, такими как пептидазы и протеазы. Пептидные расщепляемые линкерные группы представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами с получением олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т.д.) и полипептидов. Пептидные расщепляемые группы не включают амидную группу ( $-C(O)NH-$ ). Амидная группа может быть образована между любым алкиленом, алкениленом или алкиниленом. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образующейся между аминокислотами с образованием пептидов и белков. Пептидная расщепляемая группа, как правило, ограничена пептидной связью (т.е. амидной связью), образующейся между аминокислотами с образованием пептидов и белков, и не включает всю амидную функциональную группу. Пептидные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой  $-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-$ , где RA и RB представляют собой R-группы двух соседних аминокислот. Эти кандидаты могут быть оценены с помощью способов, аналогичных описанным выше.

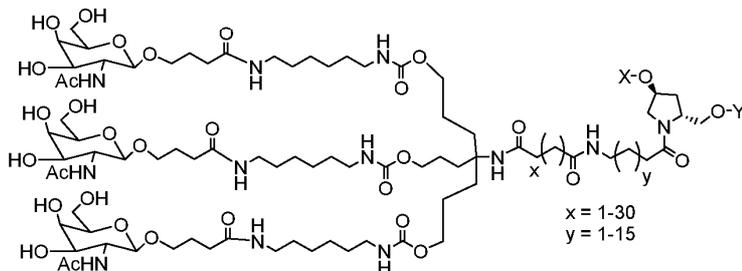
В одном варианте осуществления iRNA по настоящему изобретению конъюгирована с углеводом через линкер. Неограничивающие примеры углеводных конъюгатов iRNA с линкерами в композициях и способах по настоящему изобретению включают без ограничения



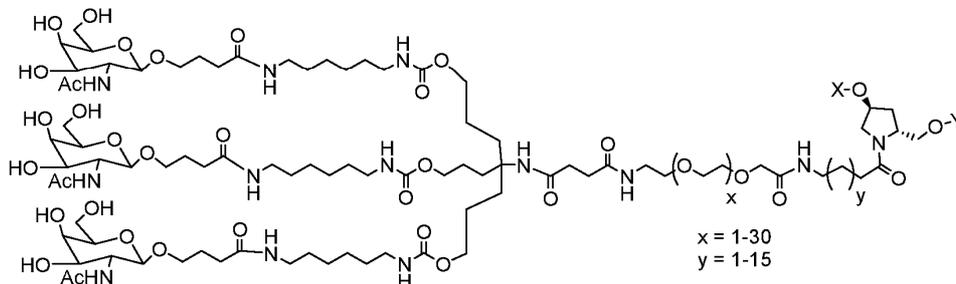
(формула XXIV),



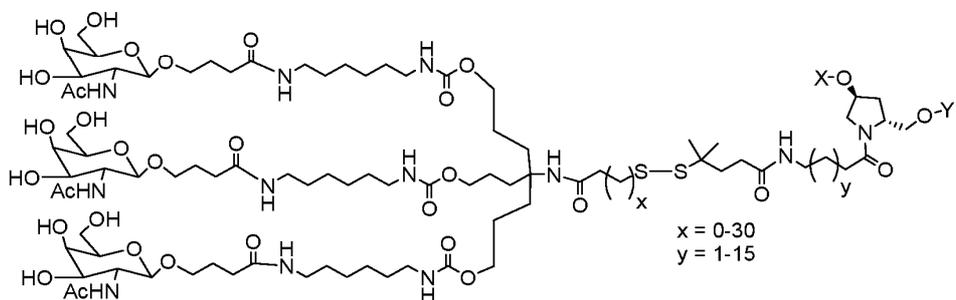
(формула XXV),



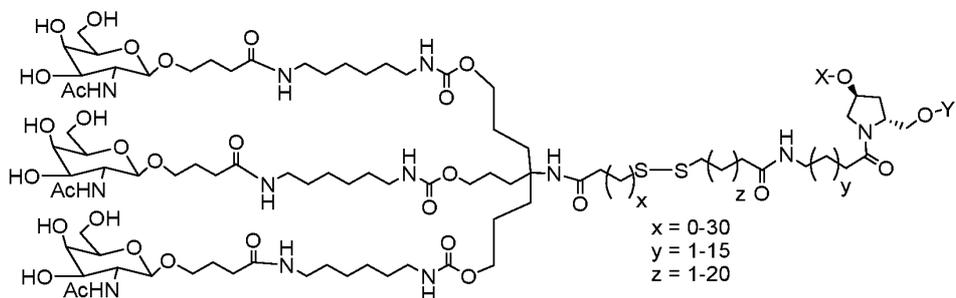
(формула XXVI),



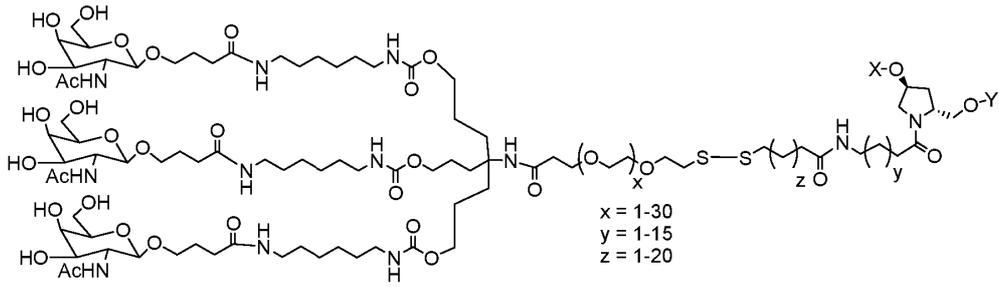
(формула XXVII),



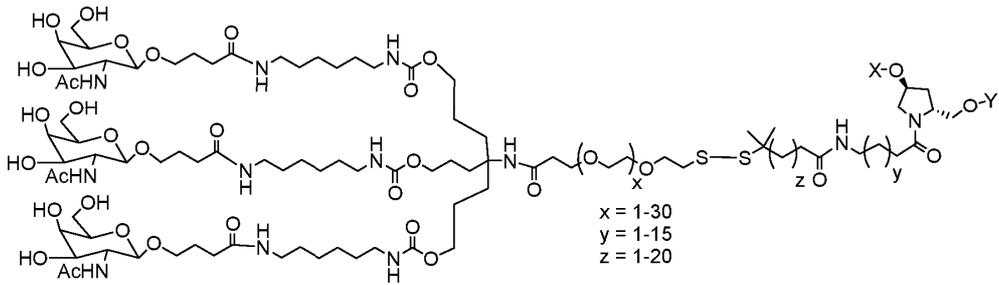
(формула XXVIII),



(формула XXIX),



(формула XXX) и



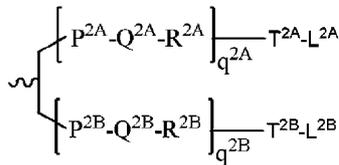
(формула XXXI),

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

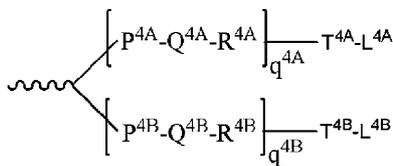
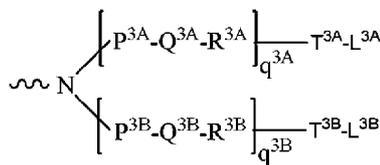
В определенных вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению лиганд представляет собой одно или несколько производных "GalNAc" (N-ацетилгалактозамина), присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления dsRNA по настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, показанных в любой из формул (XXXII)-(XXXV):

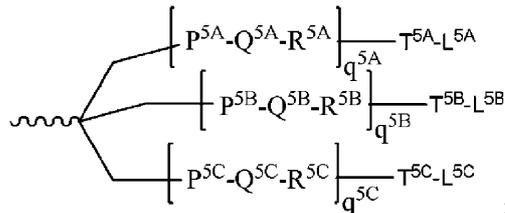
формула XXXII



формула XXXIII



формула XXXIV

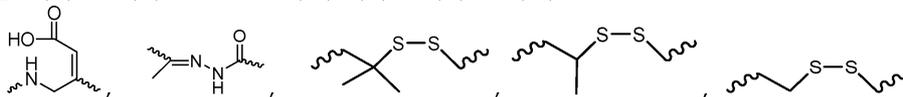


формула XXXV

где  $q_{2A}$ ,  $q_{2B}$ ,  $q_{3A}$ ,  $q_{3B}$ ,  $q_{4A}$ ,  $q_{4B}$ ,  $q_{5A}$ ,  $q_{5B}$  и  $q_{5C}$  равняются независимо в каждом случае 0-20, и где повторяющиеся звенья могут быть одинаковыми или различными;

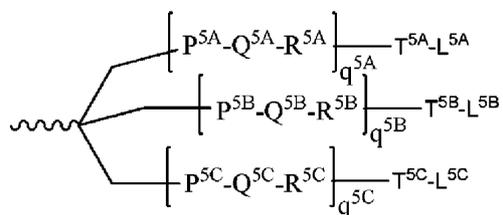
каждый из  $P^{2A}$ ,  $P^{2B}$ ,  $P^{3A}$ ,  $P^{3B}$ ,  $P^{4A}$ ,  $P^{4B}$ ,  $P^{5A}$ ,  $P^{5B}$ ,  $P^{5C}$ ,  $T^{2A}$ ,  $T^{2B}$ ,  $T^{3A}$ ,  $T^{3B}$ ,  $T^{4A}$ ,  $T^{4B}$ ,  $T^{5A}$ ,  $T^{5B}$ ,  $T^{5C}$  независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH или CH<sub>2</sub>O;

$Q^{2A}$ ,  $Q^{2B}$ ,  $Q^{3A}$ ,  $Q^{3B}$ ,  $Q^{4A}$ ,  $Q^{4B}$ ,  $Q^{5A}$ ,  $Q^{5B}$ ,  $Q^{5C}$  независимо для каждого случая отсутствуют, представляют собой алкилен, замещенный алкилен, где один или несколько метиленов могут прерываться или оканчиваться одним или несколькими из O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R<sup>N</sup>), C(R')=C(R''), C≡C или C(O); каждый из  $R^{2A}$ ,  $R^{2B}$ ,  $R^{3A}$ ,  $R^{3B}$ ,  $R^{4A}$ ,  $R^{4B}$ ,  $R^{5A}$ ,  $R^{5B}$ ,  $R^{5C}$  независимо в каждом случае отсутствует, представляет собой NH, O, S, CH<sub>2</sub>, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R<sup>a</sup>)C(O), -C(O)-CH(R<sup>a</sup>)-NH-, CO, CH=N-O,



или гетероцикл;  $L^{2A}$ ,  $L^{2B}$ ,  $L^{3A}$ ,  $L^{3B}$ ,  $L^{4A}$ ,  $L^{4B}$ ,  $L^{5A}$ ,  $L^{5B}$  и  $L^{5C}$  представляют собой лиганд; т.е. каждый из них независимо для каждого случая представляет собой моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и  $R^a$  представляет собой H или аминокислотную боковую цепь. Трехвалентно конъюгированные производные GalNAc особенно пригодны для применения со средствами для RNAi для ингибирования экспрессии целевого гена, например, такие, которые имеют формулу (XXXV):

формула XXXV



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

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

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения конъюгатов РНК, включают без ограничения патенты США

№№ 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313;  
 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,591,584;  
 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603;  
 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735;  
 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263;  
 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963;  
 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022;  
 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873;  
 5,317,098; 5,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463;  
 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810;  
 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696;  
 5,599,923; 5,599,928 и 5,688,941; 6,294,664; 6,320,017;  
 6,576,752; 6,783,931; 6,900,297; 7,037,646; 8,106,022,

Полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Необязательно, чтобы все положения в данном соединении были однотипно модифицированными, а в действительности несколько из вышеуказанных модификаций могут быть включены в отдельное соединение или даже в отдельный нуклеозид в iRNA. Настоящее изобретение также включает соединения на основе iRNA, которые представляют собой химерные соединения.

"Химерные" соединения на основе iRNA или "химеры" в контексте настоящего изобретения представляют собой соединения на основе iRNA, предпочтительно dsRNA, которые содержат два или более химически отличающихся участка, каждый из которых состоит по меньшей мере из одного мономерного звена, т.е. нуклеотида, в случае соединения на основе dsRNA. Такие iRNA обычно содержат по меньшей мере один участок, где РНК модифицирована таким образом, чтобы наделять iRNA повышенной устойчивостью к разрушению нуклеазами, повышенным клеточным захватом и/или повышенной аффинностью связывания в отношении целевой нуклеиновой кислоты. Дополнительный участок iRNA может служить в качестве субстрата для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. В качестве примера РНКазы H является клеточной эндонуклеазой, которая расщепляет нить РНК в РНК:ДНК-дуплексе. Активация РНКазы H, следовательно, приводит к расщеплению целевой РНК, значительно повышая тем самым эффективность ингибирования экспрессии гена с помощью iRNA. Следовательно, сравнимые результаты зачастую можно получить с более короткими iRNA при применении химерных dsRNA по сравнению с фосфоротиоатными дезокси-гибридизациями dsRNA того же целевого участка. Расщепление РНК-мишени обычно можно обнаружить с помощью гель-электрофореза и при необходимости с помощью методик гибридизации ассоциированных нуклеиновых кислот, известных в данной области.

В некоторых случаях РНК из числа iRNA может быть модифицирована группой, не являющейся

лигандом. Ряд молекул, не являющихся лигандами, конъюгировали с iRNA для усиления активности, распределения в клетке или клеточного поглощения iRNA, и процедуры для выполнения таких типов конъюгирования доступны в научной литературе. Такие фрагменты, не являющиеся лигандами, имеют включенные липидные фрагменты, такие как холестерин (Kubo, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365 (1):54-61; Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), холевую кислоту (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), простой тиоэфир, например, гексил-S-триптилтиол (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), тиохолестерин (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), алифатическую цепь, например, остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J*, 1991, 10:111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или триэтил-аммоний 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), полиамин или полиэтиленгликолевую цепь (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969) или адамантануксусную кислоту (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229) или октадециламиновый или гексиламинокарбонилхлестеринный фрагмент (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Иллюстративные патенты Соединенных Штатов, в которых изложена идея получения таких конъюгатов РНК, были приведены выше. Типичные схемы конъюгирования предусматривают синтез РНК, несущих аминоклипер в одном или нескольких положениях последовательности. Аминогруппа затем вступает в реакцию с молекулой, подлежащей конъюгации, с применением соответствующего конденсирующего или активирующего реагента. Реакцию конъюгирования можно выполнять с РНК, все еще связанной с твердой подложкой, либо после расщепления РНК, в фазе раствора. Очистка конъюгата РНК с помощью HPLC, как правило, обеспечивает получение чистого конъюгата.

#### V. Доставка iRNA по настоящему изобретению.

Доставку iRNA по настоящему изобретению к клетке, например, клетке субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект с заболеванием, нарушением или состоянием, ассоциированным с экспрессией гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови), можно осуществлять различными путями. Например, доставку можно осуществлять путем приведения клетки в контакт с iRNA по настоящему изобретению либо *in vitro*, либо *in vivo*. Доставку *in vivo* также можно осуществлять непосредственно путем введения субъекту композиции, содержащей iRNA, например dsRNA. В качестве альтернативы доставку *in vivo* можно осуществлять опосредованно путем введения одного или нескольких векторов, которые кодируют iRNA и управляют ее экспрессией. Такие альтернативные случаи дополнительно описаны ниже.

Обычно любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) может быть адаптирован для применения с iRNA по настоящему изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 и WO94/02595, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Что касается доставки *in vivo*, то факторы, которые учитывают в контексте доставки молекулы iRNA, включают, например, биологическую стабильность доставляемой молекулы, предупреждение неспецифических эффектов и накопление доставляемой молекулы в целевой ткани. Неспецифические эффекты iRNA могут быть сведены к минимуму путем локального введения, например путем прямой инъекции или вживления в ткань, или местного введения препарата. Локальное введение в место обработки максимально увеличивает локальную концентрацию средства, ограничивает воздействие средства на системные ткани, которые в ином случае могут быть повреждены средством или которые могут разрушить средство, и позволяет вводить более низкую общую дозу молекулы iRNA. Из результатов нескольких исследований виден эффективный нокдаун генных продуктов при локальном введении iRNA. Например, было показано, что внутриглазная доставка dsRNA к VEGF как путем инъекции в стекловидное тело макаков-крабоедов (Tolentino, M.J., et al. (2004) *Retina* 24:132-138), так и путем субретинальных инъекций мышам (Reich, S.J., et al. (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) предупреждают неоваскуляризацию в экспериментальной модели возрастной макулярной дистрофии. Кроме того, прямая внутриопухолевая инъекция dsRNA мышам снижает объем опухолей (Pille, J., et al. (2005) *Mol. Ther.* 11:267-274) и может продлевать время жизни мышей с опухолями (Kim, W.J., et al. (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350; Li, S., et al. (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523). Также было показано, что РНК-интерференция была успешной при локальной доставке в CNS (ЦНС) путем прямой инъекции (Dorn, G., et al. (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, P.H., et al. (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H., et al. (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, G.T., et al. (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, E.R., et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya, Y., et al. (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602) и в легкие путем интраназального введения (Howard, K.A., et al. (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X., et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Bitko, V., et al. (2005) *Nat. Med.* 11:50-55). Что касается системного введения iRNA для лечения заболевания, то РНК может быть модифицирована или альтернативно доставлена при помощи системы доставки лекарственного средства; оба способа служат для предупреждения быстрого разрушения dsRNA эндо- и экзонуклеазами *in vivo*. Модификация РНК или фармацевтический носитель также могут делать возможным нацеливание композиции с iRNA на целевую ткань, и с их помощью можно избежать нежела-

тельных нецелевых эффектов. Молекулы iRNA можно модифицировать с помощью химического конъюгирования с липофильными группами, такими как холестерин, для повышения поглощения клеткой и предупреждения разрушения. Например, направленную против ApoB iRNA, конъюгированную с липофильным фрагментом, представляющим собой холестерин, вводили системно мышам, что приводило к нокдауну мРНК apoB как в печени, так и в тонкой кишке (Soutschek, J., et al. (2004) *Nature* 432:173-178). Как было показано, конъюгация iRNA с аптамером ингибирует рост опухоли и опосредует регресс опухоли на мышинных моделях рака предстательной железы (McNamara, J.O., et al. (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). В альтернативном варианте осуществления iRNA можно доставлять с помощью систем доставки лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки способствуют связыванию молекулы iRNA (отрицательно заряженной), а также усиливают взаимодействия на отрицательно заряженной клеточной мембране с обеспечением эффективного поглощения iRNA клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут быть либо связанными с iRNA, либо на них воздействуют с образованием везикулы или мицеллы (см., например, Kim S.H., et al. (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), которые заключают в себя iRNA. Образование везикул или мицелл также предупреждает разрушение iRNA при системном введении. Способы получения и введения катионных комплексов с iRNA находятся в пределах квалификации специалиста в данной области (см., например, Sorensen, DR., et al. (2003) *J. Mol. Biol.* 327:761-766; Verma, U.N., et al. (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, A.S. et al. (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственных средств, применимых для системной доставки iRNA, включают DOTAP (Sorensen, D.R., et al. (2003), выше; Verma, U.N., et al. (2003), выше), олигофектамин, "твердые частицы с нуклеиновой кислотой-липидом" (Zimmermann, T.S., et al. (2006) *Nature* 441:111-114), кардиолипин (Chien, P.Y., et al. (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A., et al. (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), полиэтиленмин (Bonnet ME., et al. (2008) *Pharm. Res.* электронная публикация перед подачей в печать 16 августа; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), содержащие Arg-Gly-Asp (RGD) пептиды (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487) и полиамидамины (Tomalia, D.A., et al. (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., et al. (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). В некоторых вариантах осуществления iRNA образует комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции с iRNA и циклодекстринами можно найти в патенте США № 7427605, который включен в данный документ посредством ссылки в полном его объеме.

А. Вектор, кодирующий iRNA по настоящему изобретению.

iRNA, целенаправленно воздействующая на ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, может экспрессироваться транскрипционными единицами, вставленными в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture, A., et al., TIG. (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., международную публикацию согласно РСТ № WO 00/22113, Congrad, международную публикацию согласно РСТ № WO 00/22114 и Congrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть временной (порядка от нескольких часов до недель) или длительной (от недель до месяцев или дольше) в зависимости от конкретной применяемой конструкции и целевых ткани или типа клеток. Такие трансгены можно вводить в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может быть интегрирующим или неинтегрирующим вектором. Трансген также может быть сконструирован с возможностью наследования его в виде экстрахромосомной плазмиды (Gassmann, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

Отдельные нить или нити iRNA могут транскрибироваться с промотора вектора экспрессии. В целевую клетку можно совместно вводить два отдельных вектора экспрессии (например, путем трансфекции или инфицирования) для экспрессии двух отдельных нитей с получением, например, dsRNA. В альтернативном случае каждая отдельная нить dsRNA может транскрибироваться с участием промоторов, оба из которых расположены в одной и той же плазмиде экспрессии. В одном варианте осуществления dsRNA экспрессируется в виде полинуклеотидов с инвертированным повтором, соединенных линкерной полинуклеотидной последовательностью так, что dsRNA имеет структуру типа "стебель-петля".

Векторы экспрессии iRNA, как правило, представляют собой ДНК-плазмиды или вирусные векторы. Векторы экспрессии, совместимые с эукариотическими клетками, предпочтительно совместимые с клетками позвоночных, можно использовать для получения рекомбинантных конструкций для экспрессии iRNA, которая описана в данном документе. Векторы экспрессии для эукариотических клеток хорошо известны в данной области и доступны из ряда коммерческих источников. Как правило, предусмотрено, что такие векторы содержат подходящие сайты рестрикции для вставки необходимого сегмента нуклеиновой кислоты. Доставка векторов, экспрессирующих iRNA, может быть системной, как например: путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в целевые клетки, эксплантированные от пациента, с последующим обратным введением пациенту или с помощью любого другого способа, который обеспечивает возможность введения в необходимую целевую клетку.

Целевые клетки можно трансфицировать плазмидами экспрессии iRNA в виде комплекса с носителями-катионными липидами (например, олигофектамином) или носителями на основе некаатионных липидов (например, Transit-ТКО™). В настоящем изобретении также рассматриваются множественные

трансфекции с помощью липидов для iRNA-опосредованных нокдаунов, целенаправленно воздействующих на различные участки целевой РНК, на протяжении недели или больше. Успешное введение векторов в клетки-хозяева можно контролировать с помощью разнообразных известных способов. Например, временную трансфекцию можно выявить с помощью репортера, такого как флуоресцентный маркер, например, зеленый флуоресцентный белок (GFP). Стабильная трансфекция клеток *ex vivo* может быть подтверждена с применением маркеров, которые обеспечивают устойчивость трансфицированной клетки к определенным факторам окружающей среды (например, к антибиотикам и лекарственным средствам), как, например, устойчивость к гигромицину В.

Системы на основе вирусных векторов, которые можно использовать со способами и композициями, описанными в данном документе, включают без ограничения (а) аденовирусные векторы;

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

Векторы, применимые для доставки iRNA, будут включать в себя регуляторные элементы (промотор, энхансер и т.д.), достаточные для экспрессии iRNA в требуемой целевой клетке или ткани. Регуляторные элементы можно выбирать для получения либо конститутивной, либо регулируемой/индуцируемой экспрессии.

Экспрессия iRNA может быть точно регулируемой, например, путем использования индуцируемой регуляторной последовательности, которая чувствительна к определенным физиологическим регуляторам, например, уровням циркулирующей глюкозы или гормонам (Docherty et al., 1994, *FASEB J.* 8:20-24). Такие индуцируемые экспрессирующие системы, подходящие для управления экспрессией dsRNA в клетках или у млекопитающих, включают, например, регулирование с помощью экдизона, с помощью эстрогена, прогестерона, тетрациклина, химических индукторов димеризации и изопропил-бета-D1-тиогалактопиранозида (IPTG). Специалист в данной области сможет выбрать соответствующую регуляторную/промоторную последовательность, опираясь на предполагаемое использование трансгена iRNA.

Можно применять вирусные векторы, которые содержат последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие iRNA.

Например, можно применять ретровирусный вектор (см. Miller et al., *Meth. Enzymol.* 217:581-599 (1993)). Данные ретровирусные векторы содержат компоненты, необходимые для правильной упаковки вирусного генома и интеграции в ДНК клетки-хозяина. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие iRNA, клонируют в один или несколько векторов, которые облегчают доставку нуклеиновой кислоты пациенту. Более подробное описание ретровирусных векторов можно найти, например, в Voese et al., *Biotherapy* 6:291-302 (1994), в котором описано применение ретровирусного вектора для доставки гена *mdr1* в гемопоэтические стволовые клетки для придания стволовым клеткам большей устойчивости к химиотерапии. Другими источниками, иллюстрирующими применение ретровирусных векторов в генной терапии, являются: Clowes et al., *J. Clin. Invest.* 93:644-651 (1994); Kiem et al., *Blood* 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4:129-141 (1993); и Grossman and Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114 (1993). Лентивирусные векторы, предусматриваемые для применения, включают, например, векторы на основе HIV (ВИЧ), описанные в патентах США № 6143520; 5665557 и 5981276, которые включены в данный документ посредством ссылки.

Также для применения в доставке iRNA по настоящему изобретению предусматриваются аденовирусы. Аденовирусы представляют собой особенно перспективные носители, например, для доставки генов в эпителий респираторного тракта. Аденовирусы естественным образом инфицируют эпителий респираторного тракта, где они вызывают заболевание с легким течением. Другими мишенями для систем доставки на основе аденовирусов являются печень, центральная нервная система, эндотелиальные клетки и мышца. Аденовирусы обладают преимуществом в том, что способны инфицировать неделящиеся клетки. В Kozarsky и Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) представлена обзорная статья о генной терапии на основе аденовирусов. В Bout et al., *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) было показано применение аденовирусных векторов для переноса генов в респираторный эпителий макаков-резусов. Дополнительные примеры применения аденовирусов в генной терапии можно найти в Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993); публикации согласно PCT WO 94/12649 и Wang, et al., *Gene Therapy* 2:775-

783 (1995). Подходящий AV-вектор для экспрессии iRNA, описанной в настоящем изобретении, способ конструирования рекомбинантного AV-вектора и способ доставки вектора в целевые клетки описаны в Xia H et al. (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010.

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

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

В случае необходимости тропизм вирусных векторов может быть модифицирован путем псевдотипирования векторов белками оболочки или другими поверхностными антигенами других вирусов или путем замещения различных вирусных капсидных белков. Например, лентивирусные векторы можно подвергать псевдотипированию поверхностными белками вируса везикулярного стоматита (VSV), вируса бешенства, вируса Эбола, вируса Мокола и т.п. AAV-векторы можно получать для нацеливания на различные клетки путем конструирования векторов так, чтобы они экспрессировали различные серотипы капсидных белков; см., например, Rabinowitz J.E. et al. (2002), *J. Virol.* 76:791-801, полное раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки.

Фармацевтический препарат на основе вектора может включать вектор в приемлемом разбавителе, или может включать матрицу замедленного высвобождения, в которую включено средство доставки генов. В качестве альтернативы в том случае, когда вектор доставки целого гена может продуцироваться нативно рекомбинантными клетками, например, ретровирусными векторами, тогда фармацевтический препарат может включать одну или несколько клеток, которые продуцируют систему доставки генов.

#### VI. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают в себя iRNA по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие iRNA, которые описаны в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие iRNA, применимы для лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией или активностью гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (т.е. гена KLKB1, гена F12 и/или гена KNG1). Такие фармацевтические композиции составляют в зависимости от способа доставки. Одним примером являются композиции, которые составлены для системного введения посредством доставки парентеральным путем, например, путем подкожной (SC), внутримышечной (IM) или внутривенной (IV) доставки. Другим примером являются композиции, которые составлены для непосредственной доставки в паренхиму головного мозга, например, путем инфузии в головной мозг, как, например, непрерывной инфузии при помощи насоса. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови.

Такие фармацевтические композиции составляют в зависимости от способа доставки. Одним примером являются композиции, которые составлены для системного введения посредством доставки парентеральным путем, например, путем внутривенной (IV) или подкожной доставки. Другим примером являются композиции, которые составлены для непосредственной доставки в печень, например, путем инфузии в печень, как, например, непрерывной инфузии с помощью насоса.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови. Как правило, приемлемая доза iRNA по настоящему изобретению будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 200,0 миллиграмм на килограмм веса тела реципиента в день, как правило, в диапазоне от приблизительно 1 до 50 мг на килограмм веса тела в день. Как правило, подходящая доза iRNA по настоящему изобретению будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 5,0 мг/кг, предпочтительно от приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 3,0 мг/кг. Схема с повторной дозой может включать введение терапевтического количества iRNA на регулярной основе, как, например, один раз в двое суток или один раз в год. В определенных вариантах осуществления iRNA вводят от приблизительно одного раза в месяц до приблизительно одного раза в квартал (т.е. приблизительно один раз каждые три месяца).

По завершению режима начального лечения лекарственные препараты можно вводить с меньшей частотой.

Специалисту в данной области будет понятно, что определенные факторы могут влиять на дозу и временные рамки, необходимые для эффективного лечения субъекта, в том числе без ограничения тяжести заболевания или нарушения, типы предшествующего лечения, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания. Кроме того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством композиции может предусматривать один период лечения или серию периодов лечения. Расчеты эффективных доз и периодов полужизни *in vivo* для отдельных iRNA, охваченных настоящим изобретением, можно проводить с применением традиционных методологий или на основе тестирования *in vivo* с применением соответствующей животной модели, как описано в другом месте в данном документе.

Достижения в области генетики мышей дали ряд мышинных моделей для изучения различных заболеваний человека, как, например, нарушений, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови.

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

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

Фармацевтические композиции и составы для местного введения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, распыляемые растворы, жидкости и порошки. Могут потребоваться или быть желательны традиционные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и т.п. Также могут быть применимы презервативы, перчатки с покрытием и т.п. Подходящие составы для местного введения включают составы, в которых iRNA, описанные в настоящем изобретении, находятся в смеси со средством для местной доставки, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие средства и поверхностно-активные вещества. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеилфосфатидилэтанолламин (DOPE), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), дистеароилфосфатидилхолин), отрицательно заряженные (например, димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG)) и катионные (например, диолеилтетраметиламинопропил (DOTAP) и диолеилфосфатидилэтанолламин (DOTMA)). iRNA, описанные в настоящем изобретении, могут быть инкапсулированы в липосомах или могут образовывать комплексы с ними, в частности с катионными липосомами. В качестве альтернативы iRNA могут образовывать комплексы с липидами, в частности с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают без ограничения арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту, эйкозановую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или сложные C<sub>1-20</sub>алкильные эфиры (например, изопропилмирилат (IPM)), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль. Составы для местного введения подробно описаны в патенте США № 6747 014, который включен в данный документ посредством ссылки.

i. А. Составы на основе iRNA, содержащие мембранные молекулярные ансамбли.

iRNA для применения в композициях и способах по настоящему изобретению могут быть составлены для доставки в мембранном молекулярном ансамбле, например в липосоме или мицелле. Используемый в данном документе термин "липосома" относится к везикуле, состоящей из амфифильных липидов, расположенных в виде по меньшей мере одного бислоя, например одного бислоя или множества бислоев. Липосомы включают однослойные и многослойные везикулы, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала, и водную внутреннюю среду. Водная часть содержит композицию на основе iRNA. Липофильный материал отделяет водную внутреннюю среду от водной внешней среды, которая, как правило, не включает композицию на основе iRNA, хотя в некоторых примерах может включать. Липосомы применимы для переноса и доставки активных ингредиентов к участку их действия. Благодаря тому, что мембрана липосомы структурно подобна биологическим мембранам, в случае введения липосом в ткань бислои липосомы сливаются с бислоем клеточных мембран. По мере того как идет слияние липосомы и клетки, внутреннее водное содержимое, которое включает iRNA, доставляется в клетку, где iRNA может специфически связываться с целевой РНК и может опосредовать RNAi. В некоторых случаях липосомы также являются специфически нацеливающими, например, для направления iRNA в конкретные типы клеток.

Липосомы, содержащие средство на основе iRNA, можно получать с помощью ряда способов. В одном примере липидный компонент липосомы растворяют в детергенте для образования мицелл из липидного компонента. Например, липидный компонент может представлять собой амфипатический катионный липид или липидный конъюгат. Детергент может характеризоваться высокой критической концентрацией мицеллообразования и может быть неионогенным. Иллюстративные детергенты включают холат, CHAPS, октилглюкозид, дезоксихолат и лауроилсаркозин. Препарат средства на основе iRNA затем добавляют к мицеллам, которые включают липидный компонент. Катионные группы липида взаимодействуют со средством на основе iRNA и конденсируются вокруг средства на основе iRNA с образованием липосомы. После конденсации моющее средство удаляют, например путем диализа, с получением липосомного препарата со средством на основе iRNA.

При необходимости соединение-носитель, которое содействует конденсации, можно добавлять в ходе реакции конденсации, например, путем контролируемого добавления. Например, соединение-носитель может быть полимером, отличным от нуклеиновой кислоты (например, спермином или спермидином). Также можно корректировать pH для содействия конденсации.

Способы получения стабильных средств для доставки полинуклеотидов, которые включают комплекс полинуклеотида/катионного липида в качестве структурных компонентов средств для доставки, дополнительно описаны, например, в WO 96/37194, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Образование липосом может также включать один или несколько аспектов иллюстративных способов, описанных в Feigner P.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987; в патенте США № 4897355; патенте США № 5171678; Bangham, et al. M. Mol. Biol. 23:238, 1965; Olson, et al., Biochim. Biophys. Acta 557:9, 1979; Szoka, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4194, 1978; Mayhew, et al., Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984; Kim, et al., Biochim. Biophys. Acta 728:339, 1983; и Fukunaga, et al., Endocrinol. 115:757, 1984. Широко применяемые методики получения липидных агрегатов с размером, соответствующим для использования в качестве средств для доставки, включают обработку ультразвуком и замораживание-оттаивание с экструзией (см., например, Mayer, et al., Biochim. Biophys. Acta 858:161, 1986). Микрофлюидизацию можно использовать в тех случаях, когда требуются стабильно малые (от 50 до 200 нм) и относительно однородные агрегаты (Mayhew, et al., Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984). Такие способы легко адаптировать для упаковки препаратов средства на основе iRNA в липосомы.

Липосомы делятся на два больших класса. Катионные липосомы представляют собой положительно заряженные липосомы, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновых кислот с образованием стабильных комплексов. Положительно заряженный комплекс нуклеиновой кислоты/липосомы связывается с отрицательно заряженной клеточной поверхностью и интернализируется в эндосому. Вследствие того, что внутри эндосомы кислый pH, липосомы разрываются, высвобождая их содержимое в цитоплазму клетки (Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985).

Липосомы, которые являются чувствительными к pH или отрицательно заряженными, захватывают нуклеиновые кислоты вместо образования комплекса с ними. Поскольку и нуклеиновая кислота, и липид имеют одинаковый заряд, то происходит отталкивание вместо образования комплекса. Тем не менее, некоторая часть нуклеиновых кислот захватывается водной внутренней средой этих липосом. Чувствительные к pH липосомы использовали для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих ген тимидинкиназы, в монослои клеток в культуре. Экспрессию экзогенного гена выявляли в целевых клетках (Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274).

Один основной тип липосомных композиций включает фосфолипиды, отличные от фосфатидилхолина природного происхождения. Композиции для нейтральных липосом, например, могут быть образованы из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Композиции для анионных липосом, как правило, образованы из димиристоилфосфатидилглицерина, тогда как анионные фузогенные липосомы образованы преимущественно из диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Другой тип липосомных композиций образован из фосфатидилхолина (PC), такого как, например, PC соевых бобов и PC яиц. Другой тип образован из смесей фосфолипидов, и/или фосфатидилхолина, и/или холестерина.

Примеры других способов введения липосом в клетки *in vitro* и *in vivo* включают патент США № 5283185; патент США № 5171678; WO 94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; Feigner, J. Biol. Chem. 269:2550, 1994; Nabel, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:11307, 1993; Nabel, Human Gene Ther. 3:649, 1992; Gershon, Biochem. 32:7143, 1993; и Strauss EMBO J. 11:417, 1992.

Также исследовали неионогенные липосомные системы для определения их пригодности в доставке лекарственных средств в кожу, в частности системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионогенные липосомные составы, содержащие Novasome™ I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome™ II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), использовали для доставки циклоспорина-A в слой дермы кожи мышей. Результаты показали, что такие неионогенные липосомные системы были эффективны в

обеспечении депонирования циклоспорина А в различных слоях кожи (Hu et al., S.T.P. Pharma. Sci., 1994, 4(6) 466).

Липосомы также включают "пространственно стабилизированные" липосомы, термин, используемый в данном документе, относится к липосомам, содержащим один или несколько специализированных липидов, которые при включении в липосомы приводят к увеличению времени полужизни в кровотоке по сравнению с липосомами, у которых отсутствуют такие специализированные липиды. Примерами пространственно стабилизированных липосом являются липосомы, в которых часть образующей везикулу липидной составляющей липосомы (А) содержит один или несколько гликолипидов, таких как моносиалоганглиозид  $G_{M1}$ , или (В) получена из одного или нескольких гидрофильных полимеров, таких как полиэтиленгликолевый (PEG) фрагмент. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, в данной области предполагают, что, по меньшей мере, для пространственно стабилизированных липосом, содержащих ганглиозиды, сфингомиелин или PEG-производные липиды, увеличенное время полужизни в кровотоке этих пространственно стабилизированных липосом является следствием сниженной степени захвата клетками ретикулоэндотелиальной системы (RES) (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

Различные липосомы, содержащие один или несколько гликолипидов, известны в данной области. Parahadjopoulos et al. (Алл. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) описали способность моносиалоганглиозида  $G_{M1}$ , сульфата галактоцереброзида и фосфатидилинозитола увеличивать время полужизни липосом в крови. Эти полученные данные были прокомментированы Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). В патенте США № 4837028 и WO 88/04924, оба из которых принадлежат Allen et al., раскрыты липосомы, содержащие (1) сфингомиелин и (2) ганглиозид  $G_{M1}$  или сложный эфир сульфата галактоцереброзида. В патенте США № 5543152 (Webb et al.) раскрыты липосомы, содержащие сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn-димиристоилфосфатидилхолин, раскрыты в WO 97/13499 (Lim et al).

В одном варианте осуществления применяют катионные липосомы. Преимущество катионных липосом заключается в том, что они способны сливаться с клеточной мембраной. Некатионные липосомы, хотя и не способны сливаться настолько эффективно с плазматической мембраной, поглощаются макрофагами *in vivo*, и их можно использовать для доставки средств на основе iRNA к макрофагам.

Дополнительные преимущества липосом включают следующие: липосомы, полученные из природных фосфолипидов, являются биосовместимыми и биоразрушаемыми; липосомы могут включать широкое разнообразие водо- и жирорастворимых лекарственных средств; липосомы могут защищать инкапсулированные в их внутренних отделениях средства на основе iRNA от метаболизма и разрушения (Rosoff в "Pharmaceutical Dosage Forms", Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245). Важными факторами, которые необходимо учитывать при получении липосомных составов, являются поверхностный заряд липида, размер везикулы и водный объем липосом.

Положительно заряженный синтетический катионный липид, хлорид N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), можно применять для образования малых липосом, которые самопроизвольно взаимодействуют с нуклеиновой кислотой с образованием комплексов липид-нуклеиновая кислота, которые способны сливаться с отрицательно заряженными липидами клеточных мембран клеток культуры тканей, что приводит к доставке средства на основе iRNA (см., например, Feigner, P.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987 и патент США № 4897355 касательно описания DOTMA и его применения с ДНК).

Аналог DOTMA, 1,2-бис(олеилокси)-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP), можно применять в комбинации с фосфолипидом с образованием везикул, образующих комплекс с ДНК. Lipofectin™ (Bethesda Research Laboratories, Гейтерсберг, Мэриленд) представляет собой эффективное средство для доставки высокоанионных нуклеиновых кислот в живые клетки культуры тканей, которое содержит положительно заряженные DOTMA-липосомы, которые самопроизвольно взаимодействуют с отрицательно заряженными полинуклеотидами с образованием комплексов. Суммарный заряд полученных комплексов является также положительным в тех случаях, когда используют липосомы с достаточным положительным зарядом. Положительно заряженные комплексы, полученные таким способом, самопроизвольно присоединяются к отрицательно заряженным клеточным поверхностям, сливаются с плазматической мембраной и эффективно доставляют функциональные нуклеиновые кислоты, например, в клетки культуры тканей. Другой коммерчески доступный катионный липид, 1,2-бис(олеилокси)-3,3-(триметиламмоний)пропан ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Индианаполис, Индиана), отличается от DOTMA тем, что олеиловые фрагменты связаны сложноэфирными, а не простыми эфирными связями.

Другие опубликованные соединения с катионными липидами включают такие соединения, которые были конъюгированы с рядом фрагментов, в том числе, например, карбоксиспермин, который был конъюгирован с одним из двух типов липидов и включает такие соединения, как 5-карбоксиспермилглициндиоктаолеоиламид ("DOGS") (Transfectam™, Promega, Мэдисон, Висконсин) и дипальмитоилфосфатидилэтаноламина 5-карбоксиспермил-амид ("DPPEs") (см., например, патент США № 5171678).

Другой конъюгат с катионным липидом предусматривает получение производных липида с помо-

щью холестерина ("DC-Choi"), которые были составлены в виде липосом в комбинации с DOPE (см., Gao, X. and Huang, L., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280, 1991). Как сообщалось, липополилизин, полученный путем конъюгации полилизина с DOPE, является эффективным для трансфекции в присутствии сыворотки (Zhou, X. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8, 1991). Сообщается, что в случае определенных клеточных линий такие липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, характеризуются более низкой токсичностью и обеспечивают более эффективную трансфекцию, чем DOTMA-содержащие композиции. Другие коммерчески доступные продукты на основе катионных липидов включают DMR1E и DMR1E-HP (Vical, Ла-Хойя, Калифорния) и Lipofectamine (DOSPA) (Life Technology, Inc., Гейтерсберг, Мэриленд). Другие катионные липиды, подходящие для доставки олигонуклеотидов, описаны в WO 98/39359 и WO 96/37194.

Липосомные составы особенно подходят для местного введения, при этом липосомы обладают некоторыми преимуществами по сравнению с другими составами. Такие преимущества включают сниженные побочные действия по отношению к высокой системной абсорбции вводимого лекарственного средства, повышенное накопление вводимого лекарственного средства в необходимой мишени и возможность введения средства на основе iRNA в кожу. В некоторых вариантах осуществления липосомы используют для доставки средства на основе iRNA к эпидермальным клеткам, а также для усиления проникновения средства на основе iRNA в дермальные ткани, например, в кожу. Например, липосомы можно вводить местно. Была описана местная доставка лекарственных средств, составленных в виде липосом, в кожу (см., например, Weiner et al., et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, vol. 2, 405-410 и du Plessis et al., *Antiviral Research*, 18, 1992, 259-265; Mannino, R.J. and Fould-Fogerite, S., *Biotechniques* 6:682-690, 1988; Itani, T. et al. *Gene* 56:267-276, 1987; Nicolau, C. et al. *Meth. Enz.* 149:157-176, 1987; Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. *Meth. Enz.* 101:512-527, 1983; Wang, C.Y. and Huang, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855, 1987).

Также исследовали неионогенные липосомные системы для определения их пригодности в доставке лекарственных средств в кожу, в частности системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Для доставки лекарственного средства в дерму кожи мышей использовали неионогенные липосомные составы, содержащие Novasome I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксизтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксизтилен-10-стеариловый эфир). Такие составы со средством на основе iRNA применимы для лечения дерматологического нарушения.

Липосомы, которые включают iRNA, могут быть получены с высокой способностью к деформации. Такая способность к деформации может позволить липосомам проникать через пору, которая меньше среднего радиуса липосомы. Например, типом способных к деформации липосом являются трансферосомы. Трансферосомы можно получать путем добавления поверхностных пограничных активаторов, обычно поверхностно-активных веществ, в стандартную липосомную композицию. Трансферосомы, которые включают средство на основе iRNA, можно доставлять, например, подкожно путем инъекции для доставки средства на основе iRNA к кератиноцитам кожи. Для того чтобы пройти сквозь неповрежденную кожу млекопитающего, липидные везикулы должны проникнуть через ряд мелких пор, каждая из которых имеет диаметр менее 50 нм, под воздействием подходящего трансдермального градиента. Кроме того, благодаря свойствам липидов, такие трансферосомы могут быть самооптимизирующимися (приспосабливаться к форме пор, например, в коже), самовосстанавливающимися и зачастую могут достигать свои мишени без разделения на фрагменты, и часто могут быть самозагружающимися.

Другие составы, пригодные в настоящем изобретении, описаны в предварительных заявках США с порядковыми № 61/018616, поданной 2 января 2008 г.; 61/018611, поданной 2 января 2008 г.; 61/039748, поданной 26 марта 2008 г.; 61/047087, поданной 22 апреля 2008 г., и 61/051528, поданной 8 мая 2008 г. В заявке согласно РСТ с № РСТ/US2007/080331, поданной 3 октября 2007 г., также описаны составы, применимые в настоящем изобретении.

Трансферосомы представляют собой еще один тип липосом и являются высокодеформируемыми липидными агрегатами, которые являются перспективными кандидатами как средства для доставки лекарственных средств. Трансферосомы могут быть описаны как липидные капельки, которые обладают настолько высокой способностью деформироваться, что они легко могут проникать через поры, меньшие, чем капельки. Трансферосомы являются приспособляемыми к окружающей среде, в которой их используют, например, они являются самооптимизирующимися (приспосабливаются к форме пор кожи), самовосстанавливающимися, зачастую достигают своих мишеней без разделения на фрагменты и часто могут быть самозагружающимися. Для получения трансферосом можно добавлять поверхностные пограничные активаторы, обычно поверхностно-активные вещества, в стандартную липосомную композицию. Трансферосомы применяли для доставки сывороточного альбумина в кожу. Как было показано, опосредованная трансферосомами доставка сывороточного альбумина была такой же эффективной, как подкожная инъекция раствора, содержащего сывороточный альбумин.

Поверхностно-активные вещества находят широкое применение в составах, таких как эмульсии (в том числе микроэмульсии) и липосомы. Наиболее распространенным способом классифицирования и ранжирования свойств многих различных типов поверхностно-активных веществ, как естественных, так

и синтетических, является применение гидрофильно-липофильного баланса (HLB).

Природа гидрофильной группы (также известной как "головка") предоставляет наиболее эффективное средство для распределения по категориям различных поверхностно-активных веществ, применяемых в составах (Rieger, в "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Если молекула поверхностно-активного вещества не ионизирована, то ее классифицируют как неионогенное поверхностно-активное вещество. Неионогенные поверхностно-активные вещества находят широкое применение в фармацевтических и косметических продуктах, и их применяют при широком диапазоне значений pH. Обычно их значения HLB находятся в диапазоне от 2 до приблизительно 18 в зависимости от их структуры. Неионогенные поверхностно-активные вещества включают неионогенные сложные эфиры, такие как сложные эфиры этиленгликоля, сложные эфиры пропиленгликоля, сложные глицероловые эфиры, сложные полиглицероловые эфиры, сложные эфиры сорбитана, сложные эфиры сахарозы и этоксилированные сложные эфиры. Неионогенные алканоамиды и простые эфиры, как например: этоксилаты жирных спиртов, пропоксилатированные спирты и этоксилированные/пропоксилатированные блок-сополимеры, также включены в данный класс. Полиоксиэтиленовые поверхностно-активные вещества являются наиболее распространенными представителями класса неионогенных поверхностно-активных веществ.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет отрицательный заряд при растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как анионное. Анионные поверхностно-активные вещества включают карбоксилаты, как например: омыляющие вещества, ацил-лактаты, ациламиды аминокислот, сложные эфиры серной кислоты, такие как алкилсульфаты и этоксилированные алкилсульфаты, сульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты, ацилизетионаты, ацилтаураты, и сульфосукцинаты, и фосфаты. Наиболее важными представителями класса анионных поверхностно-активных веществ являются алкилсульфаты и омыляющие вещества.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет положительный заряд при растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как катионное. Катионные поверхностно-активные вещества включают соли четвертичного аммония и этоксилированные амины. Соли четвертичного аммония являются наиболее используемыми представителями данного класса.

Если молекула поверхностно-активного вещества обладает способностью нести и положительный, и отрицательный заряд, то поверхностно-активное вещество классифицируют как амфотерное. Амфотерные поверхностно-активные вещества включают производные акриловой кислоты, замещенные алкиламиды, N-алкилбетаины и фосфатиды.

Было рассмотрено применение поверхностно-активных веществ в готовых лекарственных формах, составах и в эмульсиях (Rieger, в "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Для применения в способах по настоящему изобретению iRNA может также предусматриваться в виде мицеллярных составов. "Мицеллы" в данном документе определены как конкретный тип молекулярной сборки, в которой амфипатические молекулы расположены в виде сферической структуры так, что все гидрофобные части молекул направлены вовнутрь, оставляя гидрофильные части в контакте с окружающей водной фазой. Противоположное расположение имеет место, если окружающая среда гидрофобная.

Смешанный мицеллярный состав, подходящий для доставки через трансдермальные мембраны, может быть получен путем смешивания водного раствора композиции на основе siRNA, C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub>алкилсульфата щелочного металла и мицеллообразующих соединений. Иллюстративные мицеллообразующие соединения включают лецитин, гиалуроновую кислоту, фармацевтически приемлемые соли гиалуроновой кислоты, гликолевую кислоту, молочную кислоту, экстракт ромашки, экстракт огурца, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, моноолеин, моноолеаты, монолаураты, масло бурачника, масло первоцвета вечернего, ментол, тригидроксиоксохоланил-глицин и его фармацевтически приемлемые соли, глицерин, полиглицерин, лизин, полилизин, триолеин, простые эфиры полиоксиэтилена и их аналоги, простые полидоканол-алкильные эфиры и их аналоги, хенодезоксихолат, дезоксихолат и их смеси. Мицеллообразующие соединения можно добавлять одновременно или после добавления алкилсульфата щелочного металла. Смешанные мицеллы будут образовываться практически при любом типе смешивания ингредиентов, но для получения мицелл с меньшим размером требуется интенсивное перемешивание.

В одном способе получают первую мицеллярную композицию, которая содержит композицию на основе siRNA и по меньшей мере алкилсульфат щелочного металла. Первую мицеллярную композицию затем смешивают по меньшей мере с тремя мицеллообразующими соединениями с образованием смешанной мицеллярной композиции. В другом способе мицеллярную композицию получают путем смешивания композиции на основе siRNA, алкилсульфата щелочного металла и по меньшей мере одного из мицеллообразующих соединений с последующим добавлением оставшихся мицеллообразующих соединений при интенсивном перемешивании.

Фенол и/или м-крезол можно добавлять к смешанной мицеллярной композиции для стабилизации

состава и защиты от роста бактерий. В качестве альтернативы фенол и/или м-крезол можно добавлять с мицеллообразующими ингредиентами.

Изотоническое средство, такое как глицерин, также можно добавлять после образования смешанной мицеллярной композиции.

Для доставки мицеллярного состава в виде распыляемого раствора состав можно поместить в аэрозольный распылитель и распылитель зарядить газом-вытеснителем. Газ-вытеснитель, который пребывает под давлением, находится в жидкой форме в распылителе. Соотношения ингредиентов корректируют так, что водная фаза и фаза газа-вытеснителя становятся единым целым, т.е. присутствует одна фаза. Если присутствуют две фазы, то необходимо встряхнуть распылитель перед распылением порции содержимого, например, через дозирующий клапан. Распыляемая доза фармацевтического средства вытесняется из дозирующего клапана в виде мелкодисперсного распыляемого раствора.

Газы-вытеснители могут включать водородсодержащие хлорфторуглероды, водородсодержащие фторуглероды, простой диметиловый эфир и простой диэтиловый эфир. В определенных вариантах осуществления можно применять HFA 134a (1,1,1,2-тетрафторэтан).

Конкретные концентрации основных ингредиентов могут быть определены путем проведения относительно простых экспериментов. Для абсорбции через ротовую полость часто требуется увеличить, например по меньшей мере удвоить или утроить, дозу, предназначенную для инъекции или введения через желудочно-кишечный тракт.

#### В. Липидные частицы.

iRNA, например dsRNA, по настоящему изобретению могут быть полностью инкапсулированы в липидном составе, например, в LNP или другой частице нуклеиновая кислота-липид.

Используемое в данном документе выражение "LNP" относится к стабильной частице нуклеиновая кислота-липид. Как правило, LNP содержат катионный липид, некаатионный липид и липид, который предупреждает агрегацию частиц (например, конъюгат PEG-липид). LNP исключительно пригодны для системных применений, поскольку они характеризуются длительным временем жизни в кровотоке после внутривенной (i.v.) инъекции и накапливаются в дистальных участках (например, участках, физически отделенных от участка введения). LNP включают "pSPLP", которая включает инкапсулированный комплекс конденсирующее средство-нуклеиновая кислота, который изложен в публикации согласно РСТ № WO 00/03683. Средний диаметр частиц по настоящему изобретению обычно составляет от приблизительно 50 нм до приблизительно 150 нм, чаще от приблизительно 60 нм до приблизительно 130 нм, чаще от приблизительно 70 нм до приблизительно 110 нм, наиболее часто от приблизительно 70 нм до приблизительно 90 нм, и они являются практически нетоксичными. Кроме того, нуклеиновые кислоты, когда присутствуют в частицах нуклеиновой кислоты-липид по настоящему изобретению, устойчивы в водном растворе к разрушению нуклеазой. Частицы нуклеиновая кислота-липид и способ их получения раскрыты, например, в патентах США № 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; публикации США № 2010/0324120 и публикации согласно РСТ № WO 96/40964.

В одном варианте осуществления соотношение липида и лекарственного средства (соотношение вес/вес) (например, соотношение липида и dsRNA) будет находиться в диапазоне от приблизительно 1:1 до приблизительно 50:1, от приблизительно 1:1 до приблизительно 25:1, от приблизительно 3:1 до приблизительно 15:1, от приблизительно 4:1 до приблизительно 10:1, от приблизительно 5:1 до приблизительно 9:1 или от приблизительно 6:1 до приблизительно 9:1. Диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Катионный липид может представлять собой, например, хлорид N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC), бромид N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), хлорид N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония (DOTAP), хлорид N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), N,N-диметил-2,3-диолеилокси)пропиламин (DODMA), 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLenDMA), 1,2-дилинолеилкарбамоилокси-3-диметиламинопропан (DLin-C-DAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(диметиламино)ацетоксипропан (DLin-DAC), 1,2-дилинолеилокси-3-морфолинопропан (DLin-MA), 1,2-дилинолеил-3-диметиламинопропан (DLinDaP), 1,2-дилинолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-диолеил-2-диолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMAP), хлористую соль 1,2-дилинолеилокси-3-триметиламинопропана (DLin-TMA-Cl), хлористую соль 1,2-дилинолеил-3-триметиламинопропана (DLin-TAP-Cl), 1,2-дилинолеилокси-3-(N-метилпиперазино)пропан (DLin-MPZ) или 3-(N,N-дилинолеил-амино)-1,2-пропандиол (DLinAP), 3-(N,N-диолеиламино)-1,2-пропандиол (DOAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(2-N,N-диметиламино)этоксипропан (DLin-EG-DMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 2,2-дилинолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA) или его аналоги, (3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]-диоксол-5-амин (ALN100), (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазандиил)дидодекан-2-ол (Tech G1) или их смесь. Катионный липид может содержать от приблизительно 20 мол.% до приблизительно 50 мол.% или приблизительно 40 мол.% от

общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В другом варианте осуществления можно использовать соединение 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан для получения наночастиц на основе липида-siRNA. Синтез 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана описан в предварительной заявке на патент США номер 61/107998, поданной 23 октября 2008 г., которая включена в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления частица на основе липида-siRNA включает 40% 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана: 10% DSPC: 40% холестерина: 10% PEG-C-DOMG (молярный процент) с размером частиц, составляющим  $63,0 \pm 20$  нм, и соотношением siRNA/липид, составляющим 0,027.

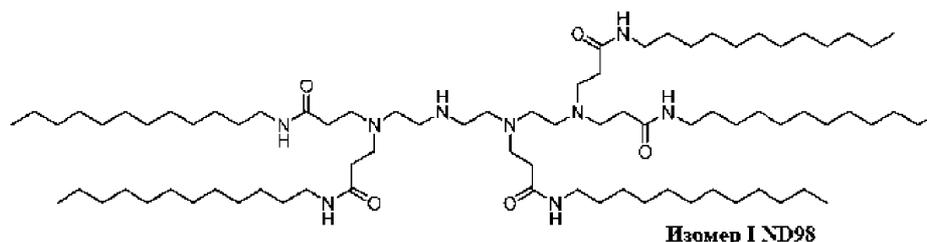
Ионизируемый/некатионный липид может представлять собой анионный липид или нейтральный липид, в том числе без ограничения дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоил-фосфатидилэтанолламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтанолламин (POPE), диолеоилфосфатидилэтанолламин-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтанолламин (DPPE), димиристоилфосфатэтанолламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтанолламин (DSPE), 16-О-монометил-PE, 16-О-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеоил-фосфатидилэтанолламин (SOPE), холестерин или их смесь. Содержание некатионного липида может составлять от приблизительно 5 мол.% до приблизительно 90 мол.%, приблизительно 10 мол.% или приблизительно 58 мол.%, если холестерин включен, от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

Конъюгированный липид, который препятствует агрегации частиц, может представлять собой, например, конъюгат полиэтиленгликоль (PEG)-липид, в том числе без ограничения PEG-диацилглицерин (DAG), PEG-диалкилоксипропил (DAA), PEG-фосфолипид, PEG-церамид (Cer) или их смесь. Конъюгат PEG-DAA может представлять собой, например, PEG-дилаурилоксипропил ( $C_{12}$ ), PEG-димиристоилоксипропил ( $C_{14}$ ), PEG-дипальмитилоксипропил ( $C_{16}$ ) или PEG-дистеарилоксипропил ( $C_{18}$ ). Содержание конъюгированного липида, который предупреждает агрегацию частиц, может составлять от 0 мол.% до приблизительно 20 мол.% или приблизительно 2 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В некоторых вариантах осуществления частица на основе нуклеиновой кислоты-липида дополнительно включает холестерин в количестве, составляющем, например, от приблизительно 10 мол.% до приблизительно 60 мол.% или приблизительно 48 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В одном варианте осуществления липидоид ND98·4HCl (MW 1487) (см. заявку на патент США № 12/056230, поданную 26 марта 2008 г., которая включена в данный документ посредством ссылки), холестерин (Sigma-Aldrich) и PEG-церамид C16 (Avanti Polar Lipids) можно использовать для получения наночастиц на основе липида-dsRNA (т.е. частиц LNP01). Маточные растворы в этаноле каждого из них могут быть получены следующим образом: ND98, 133 мг/мл; холестерин, 25 мг/мл, PEG-церамид C16, 100 мг/мл. Маточные растворы ND98, холестерина и PEG-церамида C16 можно затем объединять, например при молярном соотношении 42:48:10. Объединенный липидный раствор можно смешивать с водным раствором dsRNA (например, в ацетате натрия, pH 5) так, чтобы конечная концентрация этанола составляла приблизительно 35-45%, а конечная концентрация ацетата натрия составляла приблизительно 100-300 мМ. Наночастицы на основе липида-dsRNA обычно образуются самопроизвольно при смешивании. В зависимости от необходимого распределения частиц по размеру полученную смесь наночастиц можно продавливать через поликарбонатную мембрану (например, с отсечением по размеру в 100 нм) с использованием, например, экструдера с термоцилиндром, как например Lipex Extruder (Northern Lipids, Inc). В некоторых случаях стадию экструзии можно пропустить. Удаление этанола и одновременная замена буфера могут быть осуществлены, например, с помощью диализа или тангенциальной поточной фильтрации. Буфер можно заменить, например фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) со значением pH, составляющим приблизительно 7, например pH, составляющим приблизительно 6,9, pH, составляющим приблизительно 7,0, pH, составляющим приблизительно 7,1, pH, составляющим приблизительно 7,2, pH, составляющим приблизительно 7,3, или pH, составляющим приблизительно 7,4.

Формула 1



Формула 1

Составы LNP01 описаны, например, в публикации международной заявки № WO 2008/042973, ко-

торая включена в данный документ посредством ссылки.

Дополнительные иллюстративные составы на основе липида-dsRNA описаны в табл. 1.

Таблица 1

	Ионизируемый/катионный липид	Катионный липид/некатионный липид/холестерин/конъюгат PEG-липид Соотношение липид:siRNA
SNALP-1	1,2-Дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)	DLinDMA/DPFC/холестерин/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) Липид:siRNA ~ 7:1
2-ХТС	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DPFC/холестерин/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 Липид:siRNA ~ 7:1
LNP05	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 Липид:siRNA ~ 6:1
LNP06	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 Липид:siRNA ~ 11:1
LNP07	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5 Липид:siRNA ~ 6:1
LNP08	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5 Липид:siRNA ~ 11:1
LNP09	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100)	ALN100/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA 10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3)	MC-3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(Бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазандиил)дидодекан-2-ол (Tech G1)	Tech G1/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA 10:1
LNP13	ХТС	ХТС/DSPC/холест./PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/холест./PEG-DMG 40/15/40/5 Липид:siRNA: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/холест./PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 Липид:siRNA: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/холест./PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA: 7:1

LNP17	MC3	MC3/DSPC/холест./PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/холест./PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/холест./PEG-DMG 50/10/35/5 Липид:siRNA: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/холест./PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/холест./PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/холест./PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA: 10:1

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин;

DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин;

PEG-DMG: PEG-дидимиристоилглицерин (C14-PEG или PEG-C14) (PEG со средн. мол. массой 2000);

PEG-DSG: PEG-дистирилглицерин (C18-PEG или PEG-C18) (PEG со средн. мол. массой 2000);

PEG-cDMA: PEG-карбамоил-1,2-димиристоилоксипропиламин (PEG со средн. мол. массой 2000).

Составы, содержащие SNALP (1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)), описаны в международной публикации № WO 2009/127060, поданной 15 апреля 2009 г., которая включена в данный документ посредством ссылки.

Составы, содержащие XTC, описаны, например, в предварительной заявке США с порядковым № 61/148366, поданной 29 января 2009 г.; предварительной заявке США с порядковым № 61/156851, поданной 2 марта 2009 г.; предварительной заявке США с порядковым №, поданной 10 июня 2009 г.; предварительной заявке США с порядковым № 61/228373, поданной 24 июля 2009 г.; предварительной заявке США с порядковым № 61/23968 6, поданной 3 сентября 2009 г., и международной заявке № PCT/US2010/022614, поданной 29 января 2010 г., которые включены в данный документ посредством ссылки.

Составы, содержащие MC3, описаны, например, в публикации США № 2010/0324120, поданной 10 июня 2010 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Составы, содержащие ALNY-100, описаны, например, в международной заявке на выдачу патента с номером PCT/US09/63933, поданной 10 ноября 2009 г., которая включена в данный документ посредством ссылки.

Составы, содержащие C12-200, описаны в предварительной заявке США с порядковым № 61/175770, поданной 5 мая 2009 г., и международной заявке № PCT/US10/33777, поданной 5 мая 2010 г., которые включены в данный документ посредством ссылки.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводных средах, капсулы, желатиновые капсулы, пакетики-саше, таблетки или минитаблетки. Могут потребоваться загустители, ароматизирующие вещества, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие средства или связующие вещества. В некоторых вариантах осуществления составы для перорального введения являются такими, в которых dsRNA, описанные в настоящем изобретении, вводят в сочетании с одним или несколькими веществами, способствующими проникновению, поверхностно-активными веществами и хелаторами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты и/или их сложные эфиры или соли, желчные кислоты и/или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли желчных кислот включают хенодезоксихолевую кислоту (CDCA) и урсодезоксиходезоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюкохолевую кислоту, гликохолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, тауродезоксихолевую кислоту, тауро-24,25-дигидрофузидат натрия и гликодигидрофузидат натрия. Подходящие жирные кислоты включают арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, мистиную кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую). В некоторых вариантах осуществления используют комбинации веществ,

способствующих проникновению, например, жирные кислоты/соли жирных кислот в комбинации с желчными кислотами/солями желчных кислот. Одной иллюстративной комбинацией является натриевая соль лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA. Дополнительные вещества, способствующие проникновению, включают простой полиоксипропилен-9-лауриловый эфир, простой полиоксипропилен-2 0-цетиловый эфир. Описанные в настоящем изобретении dsRNA могут быть доставлены перорально, в форме гранул, в том числе частиц, высушенных распылением, или в комплексе с образованием микро- или наночастиц. Комплексообразующие средства для dsRNA включают полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксэтаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные виды желатина, альбумины, виды крахмала, акрилаты, полиэтиленгликоли (PEG) и виды крахмала; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-производные полиимины, поллуланы, виды целлюлозы и виды крахмала. Подходящие комплексообразующие средства включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, полидиэтиламинометилэтилен (PTDAE), полиаминоэтилен (например, п-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), DEAE-метаакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D,L-молочную кислоту), сополимер DL-молочной и гликолевой кислот (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG). Составы для перорального введения для dsRNA и их получение описаны подробно в патенте США № 6887906, в публикации патента США № 20030027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

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

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

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

Композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в какой-либо из многих возможных лекарственных форм, как, например, без ограничения таблеток, капсул, желатиновых капсул, жидких сиропов, мягких гелей, суппозиториях и клизм. Композиции по настоящему изобретению также могут быть составлены в виде суспензий в водных, неводных или смешанных средах. Водные суспензии дополнительно могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, в том числе, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

### C. Дополнительные составы.

#### i. Эмульсии.

Композиции по настоящему изобретению могут быть получены и составлены в виде эмульсий. Эмульсии, как правило, являются гетерогенными системами одной жидкости, диспергированной в другой в форме капелек, диаметр которых обычно превышает 0,1 мкм (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8<sup>th</sup> ed.), New York, NY; Idson в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al. в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Эмульсии зачастую представляют собой двухфазные системы, содержащие две несмешиваемые жидкие фазы, тщательно перемешанные и диспергированные одна в другой. Как правило, эмульсии могут быть эмульсиями по типу либо "вода в масле" (w/o), либо "масло в воде" (o/w). В тех случаях, когда водная фаза является тонкораспыленной в общем объеме масляной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "вода в масле" (w/o). В качестве альтернативы в тех случаях, когда масляная фаза является тонкораспы-

ленной в общем объеме водной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "масло в воде" (o/w). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты в дополнение к диспергированным фазам и активное лекарственное средство, которое может присутствовать в виде раствора либо в водной фазе, масляной фазе, либо собственно в качестве отдельной фазы. Фармацевтические наполнители, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты, могут присутствовать в эмульсиях при необходимости. Фармацевтические эмульсии также могут представлять собой множественные эмульсии, которые состоят из более чем двух фаз, такие как например в случае эмульсий по типу "масло-в-воде-в-масле" (o/w/o) и "вода-в-масле-в-воде" (w/o/w). Такие сложные составы часто обеспечивают определенные преимущества, которые не обеспечивают простые двухкомпонентные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные масляные капельки эмульсии по типу o/w включают маленькие водные капельки, составляют эмульсию по типу w/o/w. Аналогично этому система масляных капелек, заключенная в каплях воды, стабилизированных в масляной диспергирующей фазе, обеспечивает эмульсию по типу o/w/o.

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

Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как сурфактанты, нашли широкое применение в составе эмульсий, и они рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8<sup>th</sup> ed.), New York, NY; Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Поверхностно-активные вещества обычно являются амфифильными и содержат гидрофильную и гидрофобную части. Соотношение гидрофильной и гидрофобной природы поверхностно-активного вещества называют гидрофильно-липофильным балансом (HLB), и оно является ценным инструментом в распределении на категории и выборе поверхностно-активных веществ при получении составов. Поверхностно-активные вещества могут быть разделены на различные классы, исходя из природы гидрофильной группы: неионогенные, анионные, катионные и амфотерные (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8<sup>th</sup> ed.), New York, NY; Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

Встречающиеся в природе эмульгаторы, используемые в эмульсионных составах, включают ланолин, пчелиный воск, фосфатиды, лецитин и гуммиарабик. Абсорбирующие основы, такие как безводный ланолин и гидрофильный вазелин, обладают гидрофильными свойствами, так что они могут впитывать воду с образованием эмульсий по типу w/o, сохраняя при этом свою полутвердую консистенцию. Тонкоизмельченные твердые вещества также использовали в качестве подходящих эмульгаторов, в особенности в комбинации с поверхностно-активными веществами и в вязких препаратах. Они включают полярные неорганические твердые вещества, такие как гидроксиды тяжелых металлов, ненабухающие глины, такие как бентонит, аттапулгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный силикат алюминия и коллоидный алюмосиликат магния, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как углерод или тристеарат глицерина.

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

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

Поскольку эмульсии зачастую содержат некоторое количество ингредиентов, таких как углеводы, белки, стеролы и фосфатиды, которые могут легко поддерживать рост микроорганизмов, то такие составы часто включают консерванты. Широко используемые консерванты, включенные в эмульсионные составы, включают метилпарабен, пропилпарабен, соли четвертичного аммония, бензалкония хлорид, сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты и борную кислоту. Антиоксиданты также обычно добавляют в эмульсионные составы для предупреждения ухудшения качества состава. Используемые антиоксиданты могут быть акцепторами свободных радикалов, как например: токоферолы, алкил галлаты, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, или восстановителями, такими как аскорбиновая кислота и метабисульфит натрия, и синергистами антиоксидантов, такими как лимонная кислота, винная кислота и лецитин.

Применение эмульсионных составов посредством дерматологического, перорального и парентерального путей и способы их получения были рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Эмульсионные составы для пероральной доставки очень широко применяют из-за удобства составления, а также с позиции эффективности при абсорбции и биодоступности (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms и Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., и Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8<sup>th</sup> ed.), New York, NY; Rosoff в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Слабительные средства на основе минеральных масел, жирорастворимые витамины и питательные препараты с высоким содержанием жира находятся в числе материалов, которые обычно вводят перорально в виде эмульсий по типу o/w.

#### ii. Микроэмульсии.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиции на основе iRNA и нуклеиновых кислот составлены в виде микроэмульсий. Микроэмульсия может быть определена как система воды, масла и амфифильного вещества, которая является отдельным оптически изотропным и термодинамически устойчивым жидким раствором (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8<sup>th</sup> ed.), New York, NY; Rosoff в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Обычно микроэмульсии являются системами, которые получают сперва путем диспергирования масла в водном растворе поверхностно-активного вещества, а затем добавления достаточного количества четвертого компонента, как правило, спирта со средней длиной цепи для образования прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также были описаны как термодинамически устойчивые, изотропически чистые дисперсии двух несмешиваемых жидкостей, которые стабилизируются межфазными пленками поверхностно-активных молекул (Leung and Shah, в Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215). Микроэмульсии обычно получают путем объединения от трех до пяти компонентов, которые включают масло, воду, поверхностно-активное вещество, вторичное поверхностно-активное вещество и электролит. Является ли микроэмульсия эмульсией по типу "вода в масле" (w/o) или по типу "масло в воде" (o/w), зависит от свойств используемого масла и поверхностно-активного вещества и от структуры и геометрической упаковки полярных головок и углеводородных хвостов молекул поверхностно-активного вещества (Schott, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

Активно изучался феноменологический подход с использованием фазовых диаграмм, и с его помощью специалистами в данной области были получены обширные данные о том, как составлять микроэмульсии (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). По сравнению с традиционными эмульсиями микроэмульсии имеют преимущество солюбилизации водонерастворимых лекарственных средств в составе термодинамически стабильных капелек, которые образуются самопроизвольно.

Поверхностно-активные вещества, используемые в получении микроэмульсий, включают без ограничения ионные поверхностно-активные вещества, неионогенные поверхностно-активные вещества, Brij 96, простые полиоксиэтиленолеиловые эфиры, сложные эфиры жирных кислот и полиглицерина, тетраглицерина монолаурат (ML310), тетраглицерина моноолеат (MO310), гексаглицерина моноолеат (PO310), гексаглицерина пентаолеат (PO500), декаглицерина монокапрат (MCA750), декаглицерина моноолеат (MO750), декаглицерина секвиолеат (SO750), декаглицерина декаолеат (DAO7 50) отдельно или в комбинации с вторичными поверхностно-активными веществами. Вторичное поверхностно-активное вещество, обычно являющееся спиртом с короткой цепью, таким как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит для увеличения межфазной текучести путем проникновения в пленку из поверхностно-активного веще-

ства и соответственно создания неупорядоченной пленки из-за пустого пространства, образующегося между молекулами поверхностно-активного вещества. Однако микроэмульсии могут быть получены без использования вторичных поверхностно-активных веществ, и в данной области известны самоэмульгирующиеся системы микроэмульсий без спирта. Водной фазой, как правило, без ограничения может быть вода, водный раствор лекарственного средства, глицерин, PEG300, PEG400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляная фаза может включать в себя без ограничения такие материалы, как Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, сложные эфиры жирных кислот, среднецепочечные (C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>) моно-, ди- и триглицериды, сложные полиоксиэтилированные эфиры жирных кислот и глицерина, жирные спирты, полиглицеролизированные глицериды, насыщенные полиглицеролизированные C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> глицериды, растительные масла и силиконовое масло.

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

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

#### iii. Микрочастицы.

Средство на основе iRNA по настоящему изобретению может быть включено в частицу, например, микрочастицу. Микрочастицы можно получать при помощи высушивания распылением, но также можно получать другими способами, в том числе лиофилизацией, выпариванием, сушкой в псевдожизненном слое, сушкой в вакууме или при помощи комбинации этих методик.

#### iv. Вещества, способствующие проникновению.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении применяют разнообразные вещества, способствующие проникновению, для воздействия на эффективную доставку нуклеиновых кислот, в частности iRNA, в кожу животных. Большинство лекарственных средств присутствуют в растворе как в ионизированной, так и в неионизированной формах. Однако, как правило, только жирорастворимые или липофильные лекарственные средства легко проходят через клеточные мембраны. Было установлено, что даже нелипофильные лекарственные средства могут проходить через клеточные мембраны, если мембрана, через которую необходимо пройти, обработана веществом, способствующим проникновению. Вдобавок к содействию диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны вещества, способствующие проникновению, также повышают проницаемость для липофильных лекарственных средств.

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

Поверхностно-активные вещества (или "сурфактанты") являются химическими структурными единицами, которые при растворении в водном растворе снижают поверхностное натяжение раствора или межфазное натяжение между водным раствором и другой жидкостью, в результате чего повышается аб-

сорбция iRNA через слизистую. Вдобавок к солям желчных кислот и жирным кислотам, эти вещества, способствующие проникновению, включают, например, лаурилсульфат натрия, простой полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир и простой полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92) и перфорированные эмульсии, такие как FC-43. Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

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

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

Хелатирующие средства, используемые применительно к настоящему изобретению, можно определить как соединения, которые удаляют ионы металла из раствора путем образования комплексов с ними, в результате чего повышается абсорбция iRNA через слизистую оболочку. В отношении их применения в качестве веществ, способствующих проникновению, в настоящем изобретении хелатирующие средства обладают дополнительным преимуществом, также выступая в качестве ингибиторов ДНКазы, поскольку большинство охарактеризованных ДНК-нуклеаз требуют двухвалентный ион металла для катализа и таким образом ингибируются хелатирующими средствами (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Подходящие хелатирующие средства включают без ограничения динатриевый этилендиаминтетраацетат (EDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат натрия, 5-метоксисалицилат и гомовалинат), N-ацилпроизводные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацилпроизводные бета-дикетоннов (енамины) (см., например, Katdare, A. et al., *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

Как используется в данном документе, нехелатирующие соединения, отличные от поверхностно-активных веществ, способствующие проникновению, могут быть определены как соединения, которые проявляют небольшую активность в качестве хелатирующих средств или в качестве поверхностно-активных веществ, но которые тем не менее повышают абсорбцию iRNA через слизистую оболочку пищеварительного тракта (см., например, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Этот класс веществ, способствующих проникновению, включает, например, ненасыщенные цикломочевины, производные 1-алкил- и 1-алкенилазацикло-алканона (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92) и нестероидные противовоспалительные средства, такие как диклофенак натрия, индометацин и фенилбутазон (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

Средства, которые повышают поглощение iRNA на клеточном уровне, также можно добавлять к фармацевтическим и другим композициям по настоящему изобретению. Например, катионные липиды,

такие как липофектин (Junichi et al., патент США № 5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (Lollo et al., заявка согласно РСТ WO 97/30731), также, как известно, усиливают поглощение dsRNA клетками. Примеры коммерчески доступных реагентов для трансфекции включают среди прочего, например, Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), 293fectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Cellfectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), DMRIE-C™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), iRNA MAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Oligofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Optifect™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), реагент для трансфекции X-tremeGENE Q2 (Roche; Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOTAP (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOSPER (Грензахерштрассе, Швейцария) или Fugene (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент Transfectam® (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент для трансфекции TransFast™ (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-20 (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-50 (Promega; Мэдисон, Висконсин), DreamFect™ (OZ Biosciences; Марсель, Франция), EcoTransfect (OZ Biosciences; Марсель, Франция), реагент для трансфекции TransPass<sup>d</sup> D1 (New England Biolabs; Ипсвич, Массачусетс, США), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции PerFectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции NeuroPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER 2 (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции Cytofectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции VascuPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции TroganPORTER™ (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), RiboFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), PlasFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), UniFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США), SureFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США) или HiFect™ (B-Bridge International, Маунтин-Вью, Калифорния, США).

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

#### v. Носители.

Определенные композиции по настоящему изобретению также содержат в составе соединения-носители. Используемый в данном документе термин "соединение-носитель" или "носитель" может относиться к нуклеиновой кислоте или ее аналогу, которые являются инертными (т.е. не обладают биологической активностью *per se*), но распознаются в качестве нуклеиновой кислоты *in vivo* процессами, которые снижают биодоступность нуклеиновой кислоты с биологической активностью, например, путем разрушения биологически активной нуклеиновой кислоты или путем содействия ее удалению из кровотока. Совместное введение нуклеиновой кислоты и соединения-носителя, как правило, с избытком последнего вещества, может привести к существенному сокращению количества нуклеиновой кислоты, извлекаемого в печени, почках или других внесосудистых депо, предположительно вследствие конкуренции между соединением-носителем и нуклеиновой кислотой за общий рецептор. Например, извлечение частично фосфоротиоатной dsRNA тканью печени может быть сокращено при ее совместном введении с полиинозиновой кислотой, сульфатом декстрана, полицитидиновой кислотой или 4-ацетиамидо-4'-изотиоцианостильбен-2,2'-дисульфокислотой (Miyao et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183).

#### vi. Наполнители.

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

Также для составления композиций по настоящему изобретению можно применять фармацевтически приемлемые органические или неорганические наполнители, подходящие для введения, отличного

от парентерального, которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают без ограничения воду, солевые растворы, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т.п.

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

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

vii. Другие компоненты.

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

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

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, включают (а) одно или несколько соединений на основе iRNA и (b) одно или несколько средств, которые действуют по механизму, отличному от iRNA, и которые применимы в лечении гемолитического нарушения. Примеры таких средств включают без ограничения противовоспалительное средство, средства против стеатоза, противовирусное средство и/или средство против фиброза.

Кроме того, другие вещества, обычно используемые для защиты печени, такие как силимарин, также можно использовать в сочетании с iRNA, описанными в данном документе. Другие средства, применимые для лечения заболеваний печени, включают телбивудин, энтекавир и ингибиторы протеазы, такие как теллапревир и другие, раскрытые, например, в публикациях заявок на патент США № 2005/0148548, 2004/0167116 и 2003/0144217, Tung et al., и в публикации заявки на патент США № 2004/0127488, Hale et al.

Токсичность и терапевтическая эффективность таких соединений могут быть определены стандартными фармацевтическими процедурами на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, для определения LD<sub>50</sub> (дозы, летальной для 50% популяции) и ED<sub>50</sub> (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение доз для токсических и терапевтических эффектов представляет собой терапевтический индекс и его можно выразить как соотношение LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Предпочтительными являются соединения, которые характеризуются высоким терапевтическим индексом.

Данные, полученные в анализах с клеточными культурами и в исследованиях на животных, можно использовать при подборе диапазона доз для применения у людей. В настоящем изобретении доза композиций, описанных в данном документе, как правило, находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который включает ED<sub>50</sub> с малой токсичностью или без таковой. Доза может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от применяемых лекарственных формы и пути введения. Для любого соединения, применяемого в способах, описанных в настоящем изобретении, терапевтически эффективную дозу можно первоначально установить по результатам анализов с клеточными культурами. Доза может быть составлена для животных моделей с целью получения диапазона циркулирующей концентрации в плазме крови соединения или при необходимости полипептидного продукта целевой последовательности (например, достижения уменьшенной концентрации полипептида), что включает IC<sub>50</sub> (т.е. концентрацию исследуемого соединения, при которой достигается полумаксимальное ингибирование симптомов), определенную на клеточной культуре. Такую информацию можно использовать для более точного определения применимых у людей доз. Уровни в плазме крови можно измерять, например, при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнении к их введению, рассматриваемому выше, iRNA, описанные в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными средствами, эффективными в лечении патологических процессов, которые опосредованы экспрессией гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (т.е. экспрессией гена KLKB1, экспрессией гена F12 и/или экспрессии гена KNG1). В любом случае курирующий врач может корректировать количество и временные рамки введения iRNA, исходя из результатов, наблюдаемых при использовании стандартных средств для измерения эффективности, известных в данной области или описанных в данном документе.

VII. Способы ингибирования экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови.

В настоящем изобретении также предусмотрены способы ингибирования экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (т.е. гена KLKB1, гена F12 и/или гена KNG1), в клетке.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способы ингибирования экспрессии гена KLKB1 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством для RNAi, например, двухнитевым средством для RNAi, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии KLKB1 в клетке, за счет чего осуществляется ингибирование экспрессии KLKB1 в клетке.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способы ингибирования экспрессии гена F12 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством для RNAi, например, двухнитевым средством для RNAi, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии F12 в клетке, за счет чего осуществляется ингибирование экспрессии F12 в клетке.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способы ингибирования экспрессии гена KNG1 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством для RNAi, например, двухнитевым средством для RNAi, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии KNG1 в клетке, за счет чего осуществляется ингибирование экспрессии KNG1 в клетке.

Приведение клетки в контакт с двухнитевым средством для RNAi, например, двухнитевым средством для RNAi, можно выполнять *in vitro* или *in vivo*. *In vivo* приведение клетки в контакт со средством для RNAi включает приведение клетки или группы клеток в организме субъекта, например субъекта-человека, в контакт со средством для RNAi. Также возможны комбинации способов приведения клетки в контакт *in vitro* и *in vivo*. Приведение клетки в контакт может быть непосредственным или опосредованным, как рассматривалось выше. Более того, приведение клетки в контакт можно выполнять посредством нацеливающего лиганда, в том числе любого лиганда, описанного в данном документе или известного в уровне техники. В предпочтительных вариантах осуществления нацеливающий лиганд представляет собой углеводный фрагмент, например лиганд, представляющий собой GalNAc<sub>3</sub>, или любой другой лиганд, который направляет средство для RNAi к участку, представляющему интерес.

Термин "ингибирование", используемый в данном документе, используют взаимозаменяемо со "снижением", "сайленсингом", "подавлением", "супрессией" и другими подобными терминами, и он включает любой уровень ингибирования.

Подразумевается, что фраза "ингибирование экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови" относится к ингибированию экспрессии любого гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (такого как, например, ген мыши, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, ген крысы, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, ген обезьяны, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, или ген человека, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови), а также вариантов или мутантов гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови.

Подразумевается, что фраза "ингибирование экспрессии KLKB1" относится к ингибированию экспрессии любого гена KLKB1 (такого как, например, ген KLKB1 мыши, ген KLKB1 крысы, ген KLKB1 обезьяны или ген KLKB1 человека), а также вариантов или мутантов гена KLKB1. Таким образом, ген KLKB1 может представлять собой ген KLKB1 дикого типа, мутантный ген KLKB1 (такой как мутантный ген KLKB1, который является причиной амилоидного отложения) или трансгенный ген KLKB1 в контексте клетки, группы клеток или организма, подвергнутых генетической манипуляции.

"Ингибирование экспрессии гена KLKB1" включает любой уровень ингибирования гена KLKB1, например, по меньшей мере, частичную супрессию экспрессии гена KLKB1. Экспрессию гена KLKB1 можно оценивать исходя из уровня или изменения уровня любой переменной, ассоциированной с экспрессией гена KLKB1, например, уровня мРНК KLKB1, уровня белка KLKB1 или количества или степени амилоидных отложений. Данный уровень можно оценивать в отдельной клетке или в группе клеток, в том числе, например, в образце, полученном от субъекта.

Подразумевается, что фраза "ингибирование экспрессии F12" относится к ингибированию экспрессии любого гена F12 (такого как, например, гена F12 мыши, гена F12 крысы, гена F12 обезьяны или гена F12 человека), а также вариантов или мутантов гена F12. Таким образом, ген F12 может представлять собой ген F12 дикого типа, мутантный ген F12 (такой как мутантный ген F12) или трансгенный ген F12 в контексте клетки, группы клеток или организма, подвергнутых генетической манипуляции.

"Ингибирование экспрессии гена F12" включает любой уровень ингибирования гена F12, например,

по меньшей мере, частичную супрессию экспрессии гена F12. Экспрессию гена F12 можно оценивать исходя из уровня или изменения уровня любой переменной, ассоциированной с экспрессией гена F12, например, уровня мРНК F12, уровня белка F12 или количества или степени амилоидных отложений. Данный уровень можно оценивать в отдельной клетке или в группе клеток, в том числе, например, в образце, полученном от субъекта.

Подразумевается, что фраза "ингибирование экспрессии KNG1" относится к ингибированию экспрессии любого гена KNG1 (такого как, например, гена KNG1 мыши, гена KNG1 крысы, гена KNG1 обезьяны или гена KNG1 человека), а также вариантов или мутантов гена KNG1. Таким образом, ген KNG1 может представлять собой ген KNG1 дикого типа, мутантный ген KNG1 (такой как мутантный ген KNG1) или трансгенный ген KNG1 в контексте клетки, группы клеток или организма, подвергнутых генетической манипуляции.

"Ингибирование экспрессии гена KNG1" включает любой уровень ингибирования гена KNG1, например, по меньшей мере, частичную супрессию экспрессии гена KNG1. Экспрессию гена KNG1 можно оценивать исходя из уровня или изменения уровня любой переменной, ассоциированной с экспрессией гена KNG1, например, уровня мРНК KNG1, уровня белка KNG1 или количества или степени амилоидных отложений. Данный уровень можно оценивать в отдельной клетке или в группе клеток, в том числе, например, в образце, полученном от субъекта.

Ингибирование можно оценивать по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких переменных, которые ассоциированы с экспрессией гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, по сравнению с контрольным уровнем. Контрольным уровнем может быть любой тип контрольного уровня, который используют в данной области, например исходный уровень до введения дозы или уровень, определенный у подобного субъекта, клетки или образца, которые не обработаны или обработаны контролем (таким как, например, контроль только с буфером или контроль с неактивным средством).

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению экспрессия гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (т.е. гена KLKB1, гена F12 и/или гена KNG1), ингибируется по меньшей мере на приблизительно 5%, по меньшей мере на приблизительно 10%, по меньшей мере на приблизительно 15%, по меньшей мере на приблизительно 20%, по меньшей мере на приблизительно 25%, по меньшей мере на приблизительно 30%, по меньшей мере на приблизительно 35%, по меньшей мере на приблизительно 40%, по меньшей мере на приблизительно 45%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 55%, по меньшей мере на приблизительно 60%, по меньшей мере на приблизительно 65%, по меньшей мере на приблизительно 70%, по меньшей мере на приблизительно 75%, по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 91%, по меньшей мере на приблизительно 92%, по меньшей мере на приблизительно 93%, по меньшей мере на приблизительно 94%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98% или по меньшей мере на приблизительно 99%.

Доказательством ингибирования экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, может служить снижение количества мРНК, экспрессируемой первой клеткой или первой группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном от субъекта), в которых транскрибируется ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, и которую или которые обрабатывали (например, посредством приведения клетки или клеток в контакт со средством для RNAi по настоящему изобретению или посредством введения средства для RNAi по настоящему изобретению субъекту, в организме которого клетки находятся или находились) так, что экспрессия гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, ингибируется по сравнению со второй клеткой или второй группой клеток, по сути, идентичных первой клетке или группе клеток, но которую или которые не обрабатывали (контрольная(контрольные) клетка(клетки)). В предпочтительных вариантах осуществления ингибирование оценивают посредством выражения уровня мРНК в обработанных клетках как процент от уровня мРНК в контрольных клетках с помощью следующей формулы:

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

В качестве альтернативы ингибирование экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, можно оценивать по снижению показателя, который функционально связан с экспрессией гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, например, с экспрессией белка KLKB1, экспрессией белка F12, экспрессией белка KNG1, отложением фибрина, образованием тромба или уровнем брадикинина. Сайленсинг гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, можно выявить в любой клетке, экспрессирующей ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, либо конститутивно, либо с помощью генной инженерии, и с помощью любого анализа, известного в данной области.

Доказательством ингибирования экспрессии белка, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, может служить снижение уровня белка, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, который экспрессируется клеткой или группой клеток (например, уровня белка, экспрессируемого в образце, полученном от субъекта). Как объяснялось выше в отношении оценки супрессии мРНК, ингибирование уровней экспрессии белка в обработанной клетке или обработанной группе клеток можно аналогично выражать как процент от уровня белка в контрольной клетке или группе контрольных клеток.

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

Уровень мРНК гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, которая экспрессируется клеткой или группой клеток, или уровень циркулирующей мРНК гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, можно определять с применением любого способа, известного в данной области, для оценки экспрессии мРНК. В одном варианте осуществления уровень экспрессии в образце гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, определяют путем выявления транскрибируемого полинуклеотида или его части, например мРНК гена KLKB1, мРНК гена F12 и/или мРНК гена KNG1. РНК можно извлекать из клеток с помощью методик извлечения РНК, включая, например, извлечение с помощью кислого фенола/гуанидинизотиоцианата (RNAzol B; Biogenesis), наборы для получения РНК RNeasy (Qiagen) или PAXgene (PreAnalytix, Швейцария). Типичные форматы анализов, в которых используется гибридизация рибонуклеиновых кислот, включают ядерные "gun-on" анализы, RT-PCR, анализы с защитой от РНКаз (Melton et al., *Nuc. Acids Res.* 12:7035), нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ* и анализы с использованием микрочипов. Циркулирующую мРНК KLKB1 можно выявить с помощью способов, описанных в PCT/US2012/043584, полное содержание которой настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления уровень экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, определяют с помощью зонда для нуклеиновой кислоты. Термин "зонд", используемый в данном документе, относится к любой молекуле, которая способна избирательно связываться со специфичным геном, вовлеченным в контактный путь активации свертывания крови. Зонды могут быть синтезированы специалистом в данной области или получены из соответствующих биологических препаратов. Специально можно сконструировать зонды, содержащие метку. Примеры молекул, которые можно использовать в качестве зондов, включают без ограничения РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

Выделенные мРНК можно использовать в анализах на основе гибридизации или амплификации, которые включают без ограничения блоттинг по Саузерну или нозерн-блот-анализы, анализы на основе полимеразной цепной реакции (PCR) и анализы с применением матриц с зондами. Один способ определения уровней мРНК включает приведение выделенной мРНК в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с мРНК KLKB1. В одном варианте осуществления мРНК иммобилизуют на твердой поверхности и приводят в контакт с зондом, например, путем разделения выделенной мРНК в агарозном геле и переноса мРНК из геля на мембрану, например, нитроцеллюлозную. В альтернативном варианте осуществления зонд(зонды) иммобилизуют на твердой поверхности и мРНК приводят в контакт с зондом(зондами), например на матрице GeneChip от Affymetrix. Специалист в данной области может легко адаптировать известные способы выявления мРНК для применения в определении уровня мРНК гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови.

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

Уровни экспрессии мРНК гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, можно контролировать с применением мембранного блота (как, например, используемого в анализе на

основе гибридизации, такого как нозерн, Саузерн, дот и т.п.) или микролунок, опытных пробирок, гелей, гранул или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанные нуклеиновые кислоты). См. патенты США № 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены в данный документ посредством ссылки. Определение уровня экспрессии KLKB1 также может включать использование зондов для нуклеиновой кислоты в растворе.

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

Уровень экспрессии белка, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, можно определять с помощью любого способа, известного в данной области, для измерения уровней белка. Такие способы предусматривают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), тонкослойную хроматографию (TLC), гипердиффузионную хроматографию, реакции преципитации в жидкости или геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одиночную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), иммунофлюоресцентные анализы, электрохемиллюминисцентные анализы и им подобные.

В некоторых вариантах осуществления эффективность способов по настоящему изобретению можно наблюдать путем выявления или отслеживания ослабления симптома заболевания, ассоциированного с внутренним путем активации свертывания крови, как, например: ослабления отека конечностей, лица, гортани, верхних дыхательных путей, живота, туловища и половых органов, продрома; опухания гортани; незудящей сыпи; тошноты; рвоты; боли в животе. Эти симптомы можно оценивать *in vitro* или *in vivo* с помощью любого способа, известного в данной области.

Термин "образец", используемый в данном документе, относится к отбору схожих жидкостей, клеток или тканей, выделенных из организма субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку крови и серозные жидкости, плазму крови, лимфу, мочу, спинномозговую жидкость, слюну, внутриглазные жидкости и им подобные. Образцы тканей могут включать образцы из тканей, органов или локальных участков. Например, образцы можно получить из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток в этих органах. В определенных вариантах осуществления образцы могут быть получены из печени (например, всей печени, или из определенных сегментов печени, или определенных типов клеток печени, таких как, например, гепатоциты), сетчатки или части сетчатки (например, пигментного эпителия сетчатки), центральной нервной системы или частей центральной нервной системы (например, желудочков или хорoidalного сплетения) или поджелудочной железы или определенных клеток или частей поджелудочной железы. В предпочтительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" означает кровь или плазму крови, взятые у субъекта. В дополнительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" относится к ткани печени или ткани сетчатки, полученным от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению средство для RNAi вводят субъекту так, что средство для RNAi доставляется к конкретному участку в организме субъекта. Ингибирование экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, можно оценивать с помощью измерения уровня или изменения уровня мРНК гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, или белка, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, в образце, полученном из жидкости или ткани из конкретного участка в организме субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления участок выбран из группы, состоящей из печени, хорoidalного сплетения, сетчатки и поджелудочной железы. Участок также может представлять собой группу или подгруппу клеток из любого из указанных выше участков. Участок также может включать клетки, которые экспрессируют конкретный тип рецептора.

VIII. Способы лечения или предупреждения заболеваний, ассоциированных с контактным путем активации свертывания крови.

В настоящем изобретении предусмотрены терапевтические и профилактические способы, которые включают введение субъекту с заболеванием, нарушением и/или состоянием, связанными с геном, вовлеченным в контактный путь активации свертывания крови, или с предрасположенностью к развитию заболевания, нарушения и/или состояния, ассоциированных с геном, вовлеченным в контактный путь активации свертывания крови, композиций, содержащих средство на основе iRNA (т.е. средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген KLKB1, средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген F12, средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген KNG1, или комбинация любого из вышеперечисленных, т.е. комбинация средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KLKB1, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген F12, или комбинация средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KNG1, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KLKB1, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KNG1, или комбинация средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген F12, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KNG1, или комбинация средства на основе iRNA, целенаправленно воз-

действующего на ген KLKB1, средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген F12, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KNG1), или фармацевтических композиций, содержащих средство на основе iRNA (т.е. средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген KLKB1, средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген F12, средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген KNG1, или комбинация любого из вышеперечисленных), или векторов, содержащих iRNA (т.е. средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген KLKB1, средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген F12, средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген KNG1, или комбинация любого из вышеперечисленного) по настоящему изобретению. Неограничивающие примеры заболеваний, ассоциированных с геном, вовлеченным в контактный путь активации свертывания крови, включают, например, тромбофилию, наследственный ангионевротический отек (НАЕ) (такой как наследственный ангионевротический отек I типа; наследственный ангионевротический отек II типа; наследственный ангионевротический отек III типа; или любой другой наследственный ангионевротический отек, вызванный повышенными уровнями брадикинина), дефицит прекалликреина, злокачественную первичную гипертензию, гипертензию, терминальную стадию почечной недостаточности, дефицит фактора Флетчера, эдему конечностей, лица, гортани, верхних дыхательных путей, живота, туловища и половых органов, продром; опухание гортани; незудящую сыпь; тошноту; рвоту; боль в животе.

В одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с геном, вовлеченным в контактный путь активации свертывания крови, представляет собой тромбофилию. В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с геном, вовлеченным в контактный путь активации свертывания крови, представляет собой НАЕ. В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с геном, вовлеченным в контактный путь активации свертывания крови, представляет собой дефицит прекалликреина. В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с геном, вовлеченным в контактный путь активации свертывания крови, представляет собой злокачественную первичную гипертензию. В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с геном, вовлеченным в контактный путь активации свертывания крови, представляет собой гипертензию. В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с геном, вовлеченным в контактный путь активации свертывания крови, представляет собой терминальную стадию почечной недостаточности. В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с геном, вовлеченным в контактный путь активации свертывания крови, представляет собой дефицит фактора Флетчера.

Способы по настоящему изобретению для лечения субъекта с заболеванием, ассоциированным с геном, вовлеченным в контактный путь активации свертывания крови, например, субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение уровня экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, и/или продуцирования белка, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови. В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы снижения уровня экспрессии гена плазменного калликреина B1 (фактора Флетчера) (KLKB1) у субъекта с наследственным ангионевротическим отеком (НАЕ). В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы снижения уровня белка KLKB1 у субъекта с НАЕ. В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы снижения уровня экспрессии гена фактора XII (фактора Хагемана) (F12) у субъекта с наследственным ангионевротическим отеком (НАЕ). В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы снижения уровня белка F12 у субъекта с НАЕ. В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы снижения уровня экспрессии гена кининогена 1 (KNG1) у субъекта с наследственным ангионевротическим отеком (НАЕ). В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы снижения уровня белка KNG1 у субъекта с НАЕ.

В настоящем изобретении также предусмотрены способы снижения уровня брадикинина у субъекта с заболеванием, ассоциированным с внутренним путем активации свертывания крови, например с тромбофилией или наследственным ангионевротическим отеком. Например, в одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способы снижения уровня брадикинина у субъекта с наследственным ангионевротическим отеком, которые включают введение субъекту терапевтически эффективного количества или профилактически эффективного количества средства на основе dsRNA по настоящему изобретению, (т.е. средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KLKB1, средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген F12, средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KNG1, или комбинации любого из вышеперечисленных, т.е. комбинации средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KLKB1, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген F12, или комбинации средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KLKB1, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KNG1, или комбинации средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген F12, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KNG1, или комбинации средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KLKB1, средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген F12, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KNG1), или фармацевтической композиции или вектора, содержащих такие средства, или комбинации таких средств.





воздействующего на ген KLKB1, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KNG1, или комбинации средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген F12, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KNG1, или комбинации средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KLKB1, средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген F12, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KNG1), или фармацевтической композиции или вектора, содержащих такие средства, или комбинации таких средств.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы предупреждения образования тромба у субъекта с риском образования тромба. Способы включают введение субъекту профилактически эффективного количества средства на основе iRNA, например dsRNA, фармацевтических композиций или векторов по настоящему изобретению, за счет чего обеспечивается предупреждение образования тромба у субъекта с риском образования тромба. В одном варианте осуществления способы профилактики (и применения) по настоящему изобретению включают введение субъекту, например человеку, профилактически эффективного количества средства на основе iRNA по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на ген KLKB1, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе iRNA по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующее на ген KLKB1, или вектора по настоящему изобретению, содержащего средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген KLKB1. В другом варианте осуществления профилактические способы (и применения) по настоящему изобретению включают введение субъекту, например человеку, профилактически эффективного количества средства на основе iRNA по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на ген F12, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе iRNA по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующее на ген F12, или вектора по настоящему изобретению, содержащего средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген F12. В еще одном варианте осуществления профилактические способы (и применения) по настоящему изобретению включают введение субъекту, например человеку, профилактически эффективного количества средства на основе iRNA по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на ген KNG1, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе iRNA по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующее на ген KNG1, или вектора по настоящему изобретению, содержащего средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген KNG1. В других вариантах осуществления профилактические способы (и применения) по настоящему изобретению включают введение субъекту, например человеку, профилактически эффективного количества комбинации средств на основе dsRNA по настоящему изобретению (т.е. комбинации средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KLKB1, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген F12, или комбинации средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KLKB1, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KNG1, или комбинации средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген F12, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KNG1, или комбинации средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KLKB1, средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген F12, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KNG1), или фармацевтической композиции или вектора, содержащих такие средства, или комбинации таких средств.

"Субъекты с риском образования тромба" включают пациентов хирургического профиля (например, субъектов, которые перенесли общее хирургическое вмешательство, стоматологическое хирургическое вмешательство, ортопедическое хирургическое вмешательство (например, хирургическое вмешательство по протезированию коленного сустава или тазобедренного сустава), хирургическое вмешательство в связи с травмой, онкологическое хирургическое вмешательство); пациентов, получающих терапию (например, субъектов с заболеванием, требующим обездвиживания, например, субъектов, соблюдающих постельный режим более трех дней, и/или субъектов с долгосрочным применением внутривенного катетера; субъектов с фибрилляцией предсердий; субъектов пожилого возраста; субъектов с нарушением функции почек; субъектов с искусственным клапаном сердца; субъектов с сердечной недостаточностью; субъектов с раком); беременных субъектов; субъектов в послеродовом периоде; субъектов, у которых ранее уже был тромб; субъектов, получающих гормонозаместительную терапию; субъектов, находящихся в сидячем положении в течение длительных периодов времени, например, в самолете или автомобиле; и субъектов с ожирением.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены способы предупреждения приступа ангионевротического отека у субъекта с НАЕ. Способы включают введение субъекту профилактически эффективного количества средства на основе iRNA, например dsRNA, фармацевтических композиций или векторов по настоящему изобретению, за счет чего обеспечивается предупреждение образования тромба у субъекта с риском образования тромба. В одном варианте осуществления способы профилактики (и применения) по настоящему изобретению включают введение субъекту, например человеку, профилактически эффективного количества средства на основе iRNA по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на ген KLKB1, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе iRNA по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующее на ген KLKB1, или век-

тора по настоящему изобретению, содержащего средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген KLKB1. В другом варианте осуществления профилактические способы (и применения) по настоящему изобретению включают введение субъекту, например человеку, профилактически эффективного количества средства на основе iRNA по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на ген F12, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе iRNA по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующее на ген F12, или вектора по настоящему изобретению, содержащего средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген F12. В еще одном варианте осуществления профилактические способы (и применения) по настоящему изобретению включают введение субъекту, например человеку, профилактически эффективного количества средства на основе iRNA по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на ген KNG1, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе iRNA по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующее на ген KNG1, или вектора по настоящему изобретению, содержащего средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген KNG1. В других вариантах осуществления профилактические способы (и применения) по настоящему изобретению включают введение субъекту, например человеку, профилактически эффективного количества комбинации средств на основе dsRNA по настоящему изобретению (т.е. комбинации средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KLKB1, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген F12, или комбинации средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KLKB1, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KNG1, или комбинации средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген F12, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KNG1, или комбинации средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KLKB1, средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген F12, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген KNG1), или фармацевтической композиции или вектора, содержащих такие средства, или комбинации таких средств.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены применения терапевтически эффективного количества средства на основе iRNA по настоящему изобретению для лечения субъекта, например, субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена KLKB1.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены применения терапевтически эффективного количества средства на основе iRNA по настоящему изобретению для лечения субъекта, например, субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена F12.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены применения терапевтически эффективного количества средства на основе iRNA по настоящему изобретению для лечения субъекта, например, субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена KNG1.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены применения средства на основе iRNA, например dsRNA, по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на ген KLKB1, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген KLKB1, в изготовлении лекарственного препарата для лечения субъекта, например, субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена KLKB1 и/или продуцирования белка KLKB1, такого как субъект с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена KLKB1, например, с заболеванием, ассоциированным с внутренним путем активации свертывания крови.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены применения средства на основе iRNA, например dsRNA, по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на ген F12, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген F12, в изготовлении лекарственного препарата для лечения субъекта, например субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена F12 и/или продуцирования белка F12, такого как субъект с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена F12, например, с заболеванием, ассоциированным с внутренним путем активации свертывания крови.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены применения средства на основе iRNA, например dsRNA, по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на ген KNG1, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген KNG1, в изготовлении лекарственного препарата для лечения субъекта, например субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена KNG1 и/или продуцирования белка KNG1, такого как субъект с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена KNG1, например, с заболеванием, ассоциированным с внутренним путем активации свертывания крови.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены применения iRNA, например dsRNA, по настоящему изобретению, для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдаю-

шего нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена KLKB1 и/или продуцирования белка KLKB1.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены применения iRNA, например dsRNA, по настоящему изобретению, для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена F12 и/или продуцирования белка F12.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены применения iRNA, например dsRNA, по настоящему изобретению, для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена KNG1 и/или продуцирования белка KNG1.

В дополнительном аспекте в изобретении предусмотрены применения средства на основе iRNA по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного препарата для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена KLKB1 и/или продуцирования белка KLKB1, таким как заболевание, ассоциированное с контактным путем активации свертывания крови.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на KLKB1, вводят субъекту с наследственным ангионевротическим отеком (HAE) и/или ассоциированным с KLKB1 заболеванием так, что экспрессия гена KLKB1, например, в клетке, ткани, крови или другой ткани или жидкости субъекта, снижается по меньшей мере на приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% или по меньшей мере на приблизительно 99% или больше при введении субъекту средства на основе dsRNA.

Способы и применения по настоящему изобретению включают введение композиции, описанной в данном документе, так, что экспрессия целевого гена KLKB1 понижается, как, например, на приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 18, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76 или на приблизительно 80 ч. В одном варианте осуществления экспрессия целевого гена KLKB1 понижается на длительный срок, например, по меньшей мере на приблизительно два, три, четыре, пять, шесть, семь дней или дольше, например, на приблизительно одну неделю, две недели, три недели или на приблизительно четыре недели или дольше.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены применения средства на основе iRNA по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного препарата для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена F12 и/или продуцирования белка F12, таким как заболевание, ассоциированное с контактным путем активации свертывания крови.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на F12, вводят субъекту с наследственным ангионевротическим отеком (HAE) и/или заболеванием, ассоциированным с контактным путем активации свертывания крови, так, что экспрессия гена F12, например, в клетке, ткани, крови или другой ткани или жидкости субъекта, снижается по меньшей мере на приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% или по меньшей мере на приблизительно 99% или больше при введении субъекту средства на основе dsRNA.

Способы и применения по настоящему изобретению включают введение композиции, описанной в данном документе, так, что экспрессия целевого гена F12 понижается, как, например, на приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 18, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76 или приблизительно 80 ч. В одном варианте осуществления экспрессия целевого гена F12 понижается на длительный срок, например, по меньшей мере на приблизительно два, три, четыре, пять, шесть, семь дней или дольше, например, на приблизительно одну неделю, две недели, три недели или на приблизительно четыре недели или дольше.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены применения средства на основе iRNA по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного препарата для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена KNG1 и/или продуцирования белка KNG1, таким как заболевание, ассоциированное с контактным путем активации свертывания крови.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на KNG1, вводят субъекту с наследственным ангионевротическим отеком (HAE) и/или заболеванием, ассоциированным с внутренним путем активации свертывания крови, так, что экспрессия гена KNG1, например, в клетке, ткани, крови или другой ткани или жидкости субъекта, снижается по меньшей мере на приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 62, 64,

65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98%, или по меньшей мере на приблизительно 99% или больше при введении субъекту средства на основе dsRNA.

Способы и применения по настоящему изобретению включают введение композиции, описанной в данном документе, так, что экспрессия целевого гена KNG1 понижается, как, например, на приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 18, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76 или на приблизительно 80 ч. В одном варианте осуществления экспрессия целевого гена KNG1 понижается на длительный срок, например, по меньшей мере на приблизительно два, три, четыре, пять, шесть, семь дней или дольше, например, на приблизительно одну неделю, две недели, три недели или на приблизительно четыре недели или дольше.

Введение dsRNA в соответствии со способами и применениями по настоящему изобретению может приводить в результате к снижению тяжести, ослаблению выраженности признаков, симптомов и/или маркеров таких заболеваний или нарушений у пациента с наследственным ангионевротическим отеком (НАЕ) и/или заболеванием, ассоциированным с контактным путем активации свертывания крови. Под "снижением" в данном контексте подразумевается статистически значимое снижение такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или приблизительно 100%.

Эффективность лечения или предупреждения заболевания можно оценивать, например, путем измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптомов, уменьшения боли, оценки качества жизни, дозы лекарственного препарата, необходимой для поддержания эффекта лечения, уровня маркера заболевания или любого другого измеряемого параметра, соответствующего указанному заболеванию, лечение которого осуществляют или предупреждение которого предусматривают. Контролирование эффективности лечения или предупреждения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров находится в компетенции специалиста в данной области. Например, эффективность лечения НАЕ можно оценивать, к примеру, с помощью периодического контроля симптомов НАЕ или уровней брадикинина. Путем сравнения последующих данных с исходными данными врач получает указание того, является ли лечение эффективным. Контролирование эффективности лечения или предупреждения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров находится в компетенции специалиста в данной области. Что касается введения iRNA, целенаправленно воздействующей на ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, или содержащей ее фармацевтической композиции, то "эффективная в отношении" заболевания, ассоциированного с контактным путем активации свертывания крови, указывает на то, что введение клинически приемлемым способом приводит в результате к благоприятному эффекту, по меньшей мере, у статистически значимой доли пациентов, к такому как ослабление симптомов, излечение, уменьшение выраженности заболевания, увеличение продолжительности жизни, улучшение качества жизни или к другому эффекту, обычно считающемуся положительным врачом, имеющим представление о лечении НАЕ и/или заболевания, ассоциированного с контактным путем активации свертывания крови, и подобными случаями.

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

Субъектам можно вводить терапевтическое количество iRNA, как, например: приблизительно 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5 мг/кг dsRNA, 2,6 мг/кг dsRNA, 2,7 мг/кг dsRNA, 2,8 мг/кг dsRNA, 2,9 мг/кг dsRNA, 3,0 мг/кг dsRNA, 3,1 мг/кг dsRNA, 3,2 мг/кг dsRNA, 3,3 мг/кг dsRNA, 3,4 мг/кг dsRNA, 3,5 мг/кг dsRNA, 3,6 мг/кг dsRNA, 3,7 мг/кг dsRNA, 3,8 мг/кг dsRNA, 3,9 мг/кг dsRNA, 4,0 мг/кг dsRNA, 4,1 мг/кг dsRNA, 4,2 мг/кг dsRNA, 4,3 мг/кг dsRNA, 4,4 мг/кг dsRNA, 4,5 мг/кг dsRNA, 4,6 мг/кг dsRNA, 4,7 мг/кг dsRNA, 4,8 мг/кг dsRNA, 4,9 мг/кг dsRNA, 5,0 мг/кг dsRNA, 5,1 мг/кг dsRNA, 5,2 мг/кг dsRNA, 5,3 мг/кг dsRNA, 5,4 мг/кг dsRNA, 5,5 мг/кг dsRNA, 5,6 мг/кг dsRNA, 5,7 мг/кг dsRNA, 5,8 мг/кг dsRNA, 5,9 мг/кг dsRNA, 6,0 мг/кг dsRNA, 6,1 мг/кг dsRNA, 6,2 мг/кг dsRNA, 6,3 мг/кг dsRNA, 6,4 мг/кг dsRNA, 6,5 мг/кг dsRNA, 6,6 мг/кг dsRNA, 6,7 мг/кг dsRNA, 6,8 мг/кг dsRNA, 6,9 мг/кг dsRNA, 7,0 мг/кг dsRNA, 7,1 мг/кг dsRNA, 7,2 мг/кг dsRNA, 7,3 мг/кг dsRNA, 7,4 мг/кг dsRNA, 7,5 мг/кг dsRNA, 7,6 мг/кг dsRNA, 7,7 мг/кг dsRNA, 7,8 мг/кг dsRNA, 7,9 мг/кг dsRNA, 8,0 мг/кг dsRNA, 8,1 мг/кг dsRNA, 8,2 мг/кг dsRNA, 8,3 мг/кг dsRNA, 8,4 мг/кг dsRNA, 8,5 мг/кг dsRNA, 8,6 мг/кг dsRNA, 8,7 мг/кг dsRNA, 8,8 мг/кг dsRNA, 8,9 мг/кг dsRNA, 9,0 мг/кг dsRNA, 9,1 мг/кг dsRNA, 9,2 мг/кг dsRNA, 9,3 мг/кг



тельно 45 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 15 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 30 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 35 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 40 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 0,25 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 4 0 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 15 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 30 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 35 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 0,25 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 15 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 0,25 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 20 мг/кг или от приблизительно 15 до приблизительно 20 мг/кг. В одном варианте осуществления, где композиция по настоящему изобретению содержит описанную в данном документе dsRNA и N-ацетилгалактозамин, субъекту можно вводить терапевтическое количество, составляющее от приблизительно 10 до приблизительно 30 мг/кг dsRNA. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также считаются частью настоящего изобретения.

Например, субъектам можно вводить терапевтическое количество iRNA, как, например, приблизительно

0,1, 0,2, 0,3,  
 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6,  
 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9,  
 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2,  
 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5,  
 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8,  
 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1,  
 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4,  
 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5,  
 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20,  
 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26,  
 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35,  
 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49

или приблизительно 50 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также считаются частью настоящего изобретения.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, например, когда двухнитевое средство для RNAi включает в себя модификацию (например, один или несколько мотивов из трех иден-



но 525 мг, приблизительно 550 мг, приблизительно 575 мг, приблизительно 600 мг, приблизительно 625 мг, приблизительно 650 мг, приблизительно 675 мг, приблизительно 700 мг, приблизительно 725 мг, приблизительно 750 мг, приблизительно 775 мг, приблизительно 800 мг, приблизительно 825 мг, приблизительно 850 мг, приблизительно 875 мг или приблизительно 900 мг.

iRNA может быть введена путем внутривенной инфузии в течение некоторого периода времени, например, в течение 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или примерно 25-минутного периода. Введение можно повторять, например, регулярно, как например: один раз в неделю, один раз в две недели (т.е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше. По завершению режима начального лечения лекарственные препараты можно вводить с меньшей частотой. Например, после введения один раз в неделю или один раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц в течение шести месяцев, или года, или дольше.

Введение iRNA может обеспечить уменьшение количества присутствующего белка, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (т.е. белка KLKB1, белка F12 и/или белка KNG1), и/или уровней брадикинина, например, в клетке, ткани, крови, моче или другой части организма пациента, по меньшей мере на приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% или по меньшей мере на приблизительно 99% или больше.

Перед введением полной дозы iRNA пациентам можно вводить меньшую дозу, такую как 5% инфузионную дозу и наблюдать у них отрицательные эффекты, как, например, аллергическую реакцию. В другом примере у пациента можно наблюдать нежелательные иммуностимулирующие эффекты, такие как повышенные уровни цитокинов (например, TNF-альфа или INF-альфа).

Благодаря ингибиторным эффектам в отношении экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, композиция в соответствии с настоящим изобретением или полученная из нее фармацевтическая композиция могут повышать качество жизни.

iRNA по настоящему изобретению можно вводить в "голой" форме, где модифицированное или немодифицированное средство на основе iRNA суспендируют непосредственно в водном или подходящем буферном растворителе, в виде "свободной iRNA". Свободную iRNA вводят в отсутствие фармацевтической композиции. Свободная iRNA может находиться в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может содержать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В одном варианте осуществления буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Значение pH и осмолярность буферного раствора, содержащего iRNA, можно корректировать с тем, чтобы он подходил для введения субъекту.

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

Субъекты, на которых будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, представляют собой субъектов с наследственным ангионевротическим отеком (HAE) и/или заболеванием или нарушением, ассоциированными с внутренним путем активации свертывания крови, описанными в данном документе.

Лечение субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, включает лечение в терапевтических и профилактических целях.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены способы и применения средства на основе iRNA или фармацевтической композиции на его основе для лечения субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, например, субъекта с заболеванием, ассоциированным с контактным путем активации свертывания крови, в комбинации с другими фармацевтическими препаратами и/или другими способами терапии, например, с помощью известных фармацевтических препаратов и/или известных способов терапии, таких как, например, применяемые в настоящее время для лечения данных нарушений.

Например, в определенных вариантах осуществления iRNA, целенаправленно воздействующая на ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, вводят в комбинации, например, со средством, применимым в лечении заболевания, ассоциированного с контактным путем активации свертывания крови, которое описано в другом месте данного документа. Например, дополнительные терапевтические средства и терапевтические способы, подходящие для лечения субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, например, субъекта с заболеванием, ассоциированным с контактным путем активации свертывания крови, включают средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на другую часть гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, андроген или терапевтическое средство, например, белок, замещающий C1INH, пептидный ингибитор калликреина, пептидный антагонист рецептора брадикинина B2 или другие терапевтические средства и/или процедуры

для лечения заболевания, ассоциированного с контактным путем активации свертывания крови, или комбинацию любого из вышеперечисленных. В одном варианте осуществления дополнительное терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из андрогена, такого как даназол или оксандролон, Berinert®, Cinryze™, Rhuconest®, Ecallantide, Firazyr®, Kalbitor®, и комбинации любого из вышеперечисленных.

В определенных вариантах осуществления первое средство на основе iRNA целенаправленно воздействующее на ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, вводят в комбинации со вторым средством на основе iRNA, целенаправленно воздействующим на другую часть гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови. Например, первое средство для RNAi содержит первую смысловую нить и первую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где практически все нуклеотиды указанной первой смысловой нити и практически все нуклеотиды указанной первой антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где первая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера; а второе средство для RNAi содержит вторую смысловую нить и вторую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где практически все нуклеотиды второй смысловой нити и практически все нуклеотиды второй антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где вторая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды первой и второй смысловой нити и/или все нуклеотиды первой и второй антисмысловой нити имеют модификацию.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидроксил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего не встречающееся в природе основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфоротиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, и нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата.

В определенных вариантах осуществления первое средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, вводят в комбинации со вторым средством на основе iRNA, целенаправленно воздействующим на ген, отличный от гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови. Например, средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген KLKB1, можно вводить в комбинации со средством на основе iRNA, целенаправленно воздействующим на ген фактора свертывания крови XII (F12). Первое средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген KLKB1, и второе средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген, отличный от гена KLKB1, например ген фактора свертывания крови XII (F12), можно вводить как части одной фармацевтической композиции. В качестве альтернативы первое средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген KLKB1, и второе средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген, отличный от гена KLKB1, например ген фактора свертывания крови XII (F12), можно вводить как части разных фармацевтических композиций.

Средство на основе iRNA и дополнительное терапевтическое средство и/или препарат можно вводить одновременно и/или в одной комбинации, например парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельной композиции, или в разные моменты времени, и/или с помощью другого способа, известного в данной области или описанного в данном документе.

В настоящем изобретении также предусмотрены способы применения средства на основе iRNA по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей средство на основе iRNA по настоящему изобретению, для снижения и/или ингибирования экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (т.е. экспрессии KLKB1, экспрессии F12 или экспрессии KNG1), в клетке. В других аспектах в настоящем изобретении предусмотрены iRNA по настоящему изобретению и/или композиция, содержащая iRNA по настоящему изобретению, для применения в снижении и/или ингибировании экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (т.е. экспрессии KLKB1, экспрессии F12 или экспрессии KNG1), в клетке. В еще других аспектах предусмотрено применение iRNA по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей iRNA по настоящему изобретению, для изготовления лекарственного препарата для снижения и/или ингибирования экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (т.е. экспрессии KLKB1, экспрессии F12

или экспрессии KNG1), в клетке. В еще одних аспектах в настоящем изобретении предусмотрены iRNA по настоящему изобретению и/или композиция, содержащая iRNA по настоящему изобретению, для применения в снижении и/или ингибировании продуцирования белка, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (т.е. продуцирования белка KLKB1, продуцирования белка F12 или продуцирования белка KNG1), в клетке. В еще одних аспектах предусмотрено применение iRNA по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей iRNA по настоящему изобретению, для изготовления лекарственного препарата для снижения и/или ингибирования продуцирования белка, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови (т.е. продуцирования белка KLKB1, продуцирования белка F12 или продуцирования белка KNG1), в клетке. Способы и применения включают приведение клетки в контакт с iRNA, например dsRNA по настоящему изобретению, и поддержание клетки в течение времени, достаточного для достижения разрушения мРНК-транскрипта гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, за счет чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, или ингибирование продуцирования белка, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, в клетке.

Снижение экспрессии гена можно оценить с помощью любых способов, известных в данной области. Например, снижение экспрессии KLKB1 можно определить путем определения уровня экспрессии мРНК KLKB1 с помощью способов, рутинных для специалиста в данной области, например, нозерн-блоттинга, qRT-PCR, путем определения уровня белка KLKB1 с помощью способов, рутинных для специалиста в данной области, таких как вестерн-блоттинг, иммунологические методики, способы проточной цитометрии, ELISA, и/или путем определения биологической активности KLKB1.

В способах и применениях по настоящему изобретению клетка может находиться в контакте *in vitro* или *in vivo*, т.е. клетка может находиться в организме субъекта.

Клетка, подходящая для лечения с применением способов по настоящему изобретению, может представлять собой любую клетку, которая экспрессирует ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, например, клетку от субъекта с наследственным ангионевротическим отеком (НАЕ) или клетку, содержащую вектор экспрессии, содержащий ген, вовлеченный в контактный путь активации свертывания крови, или часть гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови. Клетка, подходящая для применения в способах и применениях по настоящему изобретению, может представлять собой клетку млекопитающего, например, клетку примата (такую как клетка человека или клетка отличного от человека примата, например, клетку обезьяны или клетку шимпанзе), клетку отличного от примата животного (такую как клетка коровы, клетка свиньи, клетка верблюда, клетка ламы, клетка лошади, клетка козы, клетка кролика, клетка овцы, клетка хомячка, клетка морской свинки, клетка кота, клетка собаки, клетка крысы, клетка мыши, клетка льва, клетка тигра, клетка медведя или клетка буйвола), клетку птицы (например, клетку утки или клетку гуся) или клетку кита. В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку человека.

Экспрессию гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, можно ингибировать в клетке по меньшей мере на приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или приблизительно 100%.

Продуцирование белка, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, можно ингибировать в клетке по меньшей мере на приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или приблизительно 100%.

*In vivo* способы и применения по настоящему изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей iRNA, где iRNA включает в себя нуклеотидную последовательность, которая комплементарна по меньшей мере части РНК-транскрипта гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, млекопитающего, подлежащего лечению. В тех случаях, когда подлежащим лечению организмом является человек, тогда композицию можно вводить при помощи любых способов, известных в данной области, в том числе без ограничения подкожным, внутривенным, пероральным, внутривентральным или парентеральным путями, включая интракраниальное (например, интравентрикулярное, интрапаренхиматозное и интратекальное), внутримышечное, трансдермальное, через верхние дыхательные пути (аэрозольное), назальное, ректальное и местное (в том числе трансбуккальное и сублингвальное) введение. В определенных вариантах осуществления композиции вводят при помощи подкожной или внутривенной инфузии или инъекции. В одном варианте осуществления композиции вводят путем подкожной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством инъекции депо-препарата. Благодаря инъекции депо-препарата, iRNA может постоянно высвобождаться в течение длительного периода времени. Таким образом, при инъекции депо-препарата можно снизить частоту введения доз, необходимых для достижения требуемого эффекта, например, требуемого ингибирования KLKB1 или терапевтического или профилактического эффекта. Инъекция депо-препарата может также

обеспечивать более устойчивые концентрации в сыворотке крови. Инъекции депо-препарата могут включать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции. В предпочтительных вариантах осуществления инъекция депо-препарата является подкожной инъекцией.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством насоса. Насос может быть внешним насосом или насосом, имплантируемым хирургическим путем. В определенных вариантах осуществления насос является подкожно имплантируемым осмотическим насосом. В других вариантах осуществления насос является инфузионным насосом. Инфузионный насос можно применять для внутривенных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. В предпочтительных вариантах осуществления инфузионный насос является инфузионным насосом для подкожных введений. В других вариантах осуществления насос является насосом, имплантируемым хирургическим путем, который доставляет iRNA в организм субъекта.

Способ введения можно выбрать, исходя из того, необходимо ли местное или системное лечение, и исходя из области, подлежащей лечению. Путь и место введения можно выбрать для усиления целенаправленного воздействия.

В одном аспекте в настоящем изобретении также предусмотрены способы ингибирования экспрессии гена KLKB1 у млекопитающего, например у человека. В настоящем изобретении также предусмотрена композиция, содержащая iRNA, например dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген KLKB1 в клетке млекопитающего, для применения в ингибировании экспрессии гена KLKB1 у млекопитающего. В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрено применение iRNA, например dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген KLKB1 в клетке млекопитающего, в изготовлении лекарственного препарата для ингибирования экспрессии гена KLKB1 у млекопитающего.

Способы и применения включают введение млекопитающему, например человеку, композиции, содержащей iRNA, например dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген KLKB1 в клетке млекопитающего, и поддержание млекопитающего в течение времени, достаточного для достижения разрушения мРНК-транскрипта гена KLKB1, за счет чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена KLKB1 у млекопитающего.

В другом аспекте в настоящем изобретении также предусмотрены способы ингибирования экспрессии гена F12 у млекопитающего, например человека. В настоящем изобретении также предусмотрена композиция, содержащая iRNA, например dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген F12 в клетке млекопитающего, для применения в ингибировании экспрессии гена F12 у млекопитающего. В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрено применение iRNA, например dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген F12 в клетке млекопитающего, в изготовлении лекарственного препарата для ингибирования экспрессии гена F12 у млекопитающего.

Способы и применения включают введение млекопитающему, например человеку, композиции, содержащей iRNA, например dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген F12 в клетке млекопитающего, и поддержание млекопитающего в течение времени, достаточного для достижения разрушения мРНК-транскрипта гена F12, за счет чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена F12 у млекопитающего.

В другом аспекте в настоящем изобретении также предусмотрены способы ингибирования экспрессии гена KNG1 у млекопитающего, например человека. В настоящем изобретении также предусмотрена композиция, содержащая iRNA, например dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген KNG1 в клетке млекопитающего, для применения в ингибировании экспрессии гена KNG1 у млекопитающего. В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрено применение iRNA, например dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген KNG1 в клетке млекопитающего, в изготовлении лекарственного препарата для ингибирования экспрессии гена KNG1 у млекопитающего.

Способы и применения включают введение млекопитающему, например человеку, композиции, содержащей iRNA, например dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген KNG1 в клетке млекопитающего, и поддержание млекопитающего в течение времени, достаточного для достижения разрушения мРНК-транскрипта гена KNG1, за счет чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена KNG1 у млекопитающего.

Снижение экспрессии гена можно оценивать в образце периферической крови субъекта, которому вводят iRNA, с помощью каких-либо способов, известных в данной области, например qRT-PCR, описанной в данном документе. Снижение продуцирования белка можно оценивать с помощью любых способов, известных в данной области, и с помощью способов, например, ELISA или вестерн-блоттинга, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления образец ткани служит в качестве тканевого материала для контроля снижения экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, и/или белка. В другом варианте осуществления образец крови служит в качестве тканевого материала для контроля снижения экспрессии гена, вовлеченного в контактный путь активации свертывания крови, и/или белка.

В одном варианте осуществления подтверждение RISC-опосредованного расщепления мишени *in vivo* после введения средства на основе iRNA осуществляют путем выполнения 5'-RACE или модификаций протокола, известного в данной области (Lasham A et al. (2010) *Nucleic Acid Res.*, 38 (3) p-e19) (Zim-

mermann et al. (2006) Nature 441:111-4).

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны быть истолкованы как ограничивающие. Полное содержание всех источников, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых в данной заявке, а также фигур и перечня последовательностей таким образом включено в данный документ посредством ссылки.

### Примеры

b. Пример 1. Синтез siRNA для KLKB1.

i. Источники получения реагентов.

Если источник получения реагента конкретно не приведен в данном документе, такой реагент можно приобрести у любого поставщика реагентов для использования в молекулярной биологии со стандартными качеством/чистотой для применения в молекулярной биологии.

Транскрипты.

Конструирование siRNA.

Набор siRNA, целенаправленно воздействующих на KLKB1, "плазменный калликреин B1 (фактор Флетчера)" человека (эталонная последовательность с номером доступа NM\_000892.3, GI:78191797, GeneID: 3818, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2) и ортологи KLKB1 из исследований видовой токсичности (яванский макак: эталонная последовательность с номером доступа XM\_005556482, GI:544436072; макак-резус: эталонная последовательность JU329355, GI:380802470; мышь: эталонная последовательность NM\_008455, GI:236465804; крыса: эталонная последовательность NM\_012725, GI:162138904) были сконструированы с помощью специально разработанных скриптов на языках R и Python. Длина эталонной последовательности мРНК KLKB1 человека составляет 2252 оснований. Логическое обоснование и способ применения набора конструкций siRNA заключались в следующем: прогнозируемую эффективность для каждой потенциальной 19-мерной siRNA от положения 72 до положения 2252 включительно мРНК KLKB1 человека (содержащей кодирующий участок и 3'-UTR) определяли с использованием линейной модели, с помощью которой прогнозировали непосредственный показатель нокдауна мРНК, исходя из данных по более чем 20000 различных конструкций siRNA, целенаправленно воздействующих на большое количество генов позвоночных. Поднаборы siRNA для KLKB1 конструировали с идеальными или почти идеальными совпадениями между человеком, яванским макаком и макаком-резусом. Дополнительный поднабор конструировали с идеальными или почти идеальными совпадениями с ортологами KLKB1 мыши или крысы. Для каждой нити siRNA в полном переборе использовали сделанный по индивидуальному заказу скрипт на языке Python для измерения количества и определения положений ошибок спаривания между siRNA и всеми потенциальными выравниваниями в транскриптоме целевого вида. Дополнительные баллы присваивали за ошибки спаривания в затравочном участке, определенном в данном случае как положения 2-9 антисмыслового олигонуклеотида, равно как и в сайте расщепления siRNA, определенном в данном случае как положения 10-11 антисмыслового олигонуклеотида.

Относительные баллы за ошибки спаривания составляли 2,8 для ошибок спаривания в затравочном участке, 1,2 для ошибок спаривания в сайте расщепления и 1 для ошибок спаривания в других положениях вплоть до положения 19 антисмыслового олигонуклеотида. Ошибки спаривания в первом положении игнорировали. Балл за специфичность рассчитывали для каждой нити путем суммирования значений каждой взвешенной ошибки спаривания. Предпочтение отдавали тем siRNA, "антисмысловой" балл которых для человека и яванского макака равнялся 3,0 или больше, и прогнозируемая эффективность представляла собой нокдаун транскрипта KLKB1, равный 70% или больше. Конструировали, синтезировали и подвергали скринингу один набор siRNA, содержащих влияющие на активность структурные модификации, включая различные паттерны с заместителями 2'-О-метил и 2'-фтор.

Подробный перечень немодифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей для KLKB1 показан в табл. 3. Подробный перечень модифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей для KLKB1 показан в табл. 4.

Синтез siRNA.

Последовательности siRNA для KLKB1 синтезировали в масштабе 1 мкмоль на синтезаторе Mermade 192 (BioAutomation) с применением фосфорамидитной химии, используя твердую подложку. Твердая подложка представляла собой стеклянную подложку с заданным размером пор (500 Å), нагруженную созданным по индивидуальному заказу лигандом GalNAc, или универсальную твердую подложку (AM biochemical). Вспомогательные реагенты для синтеза, 2'-F- и 2'-О-метил-РНК и дезоксо-фосфорамидиты, получали от Thermo-Fisher (Милуоки, Висконсин) и HONGGENE (Китай). 2'F, 2'-О-метил, GNA (гликоль-нуклеиновые кислоты), 5'-фосфат и другие модификации вводили с использованием соответствующих фосфорамидитов. Синтез отдельных нитей, конъюгированных с GalNAc по 3'-концу, выполняли на модифицированной GalNAc CPG-подложке. Сделанную по индивидуальному заказу универсальную твердую CPG-подложку использовали для синтеза отдельных антисмысловых нитей. Время связывания для всех фосфорамидитов (100 мМ в ацетонитриле) составляло 5 мин при использовании 5-этилтио-И-тетразола (ETT) в качестве активатора (0,6 М в ацетонитриле). Фосфоротиоатные связи получали с использованием 50 мМ раствора 3-((диметиламино-метилиден)амино)-3Н-1,2,4-дигидро-3-тиола (DDTT, получали от Chemgenes (Уилмингтон, Массачусетс, США)) в безводном ацетонитриле/пиридине (1:1

объем/объем). Время окисления составляло 3 мин. Все последовательности синтезировали с удалением в конечном итоге группы DMT ("без DMT").

По завершении твердофазного синтеза олигорибонуклеотиды отщепляли от твердой подложки и с них снимали защитную группу в запечатанных планшетах с 96 глубокими лунками с использованием 200 мкл реагента в виде водного метиламина при 60°C в течение 20 мин. Для последовательностей, содержащих 2'-рибозные остатки (2'-ОН), которые были защищены группой трет-бутилдиметилсилила (TBDMS), вторую стадию снятия защиты выполняли с применением реагента TEA·3HF (триэтиламина тригидрофторида). Для удаления защитных групп в раствор метиламина добавляли 200 мкл диметилсульфоксида (DMSO) и 300 мкл реагента TEA·3HF и раствор инкубировали в течение дополнительных 20 мин при 60°C. В конце стадии отщепления и удаления защитных групп планшету для синтеза давали достичь комнатной температуры и в нем проводили осаждение путем добавления 1 мл смеси ацетонитрил:этанол (9:1). Планшеты охлаждали при -80°C в течение 2 ч и супернатант аккуратно удаляли при помощи многоканальной пипетки. Осадок с олигонуклеотидами ресуспендировали в 20 мМ буфера NaOAc и обессоливали с использованием 5 мл колонки для эксклюзионной хроматографии HiTrap (GE Healthcare) на "AKTA Purifier System", оснащенной устройством автоматической подачи образцов A905 и коллектором фракций Frac 950. Обессоленные образцы собирали в 96-луночные планшеты. Образцы из каждой последовательности анализировали при помощи LC-MS для подтверждения идентичности, УФ (260 нм) для количественного определения, а выбранный набор образцов анализировали при помощи IEX-хроматографии для определения чистоты.

Гибридизацию отдельных нитей KLKB1 осуществляли на автоматическом устройстве Тесап для манипуляции с жидкостями. Эквимолярную смесь смысловых и антисмысловых отдельных нитей объединяли и гибридизовали в 96-луночных планшетах. После объединения отдельных комплементарных нитей 96-луночный планшет плотно запечатывали и нагревали в печи при 100°C в течение 10 мин, и позволяли ему медленно достичь комнатной температуры за период 2-3 ч. Концентрацию каждого дуплекса нормализовали к 10 мкМ в 1X PBS и затем подвергали скрининговым анализам *in vitro*.

Пример 2. Скрининг дуплексов siRNA для KLKB1 *in vitro*.

Культура клеток и трансфекции.

Клетки Cos7 (ATCC, Манассас, Вирджиния) выращивали практически до конfluence при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в DMEM (ATCC), дополненной 10% FBS, до отделения от планшета путем трипсинизации. Конструкции с использованием системы люцифераз Dual-Glo® создавали в плазмиде psiCHECK2, содержащей либо геномную последовательность KLKB1 человека размером примерно 2,2 т. о, либо геномную последовательность ортолога KLKB1 мыши размером 2,5 т.о. Каждую плазмиду с люциферазами из двух источников совместно трансфицировали с siRNA в примерно 15×10<sup>4</sup> клеток с применением Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по каталогу 11668-019). В каждой лунке 96-луночного планшета добавляли 0,2 мкл Lipofectamine к 10 нг плазмидного вектора и одной siRNA (табл. 3 и 4) в 14,8 мкл Opti-MEM и оставляли для образования комплексов при комнатной температуре на 15 мин. Затем смесь добавляли к клеткам, которые ресуспендировали в 80 мкл свежей полной среды. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед измерением активности люциферазы.

Эксперименты с однократной дозой выполняли при конечной концентрации дуплекса 10 и 0,01 нМ и эксперименты в отношении дозозависимого эффекта проводили в пределах диапазона конечной концентрации дуплекса от 10 нМ до 36 фМ с использованием 8-, 6-кратных разведений.

Анализ с использованием системы люцифераз Dual-Glo®.

Через сорок восемь часов после трансфекции с использованием siRNA измеряли активность люциферазы светлячка (контроль трансфекции) и Rinella (слитой с целевой последовательностью KLKB1). Сначала отделяли клетки от среды. Затем измеряли активность люциферазы светлячка путем добавления в каждую лунку 75 мкл реагента люциферазы Dual-Glo®, что равно объему культуральной среды, и перемешивали. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин перед измерением люминесценции (при 500 нм) на Spectramax (Molecular Devices) для выявления сигнала от люциферазы светлячка. Активность люциферазы Renilla измеряли путем добавления в каждую лунку 75 мкл реагента Dual-Glo® Stop & Glo® комнатной температуры и планшеты инкубировали в течение 10-15 мин перед повторным измерением люминесценции для определения сигнала люциферазы Renilla. Реагент Dual-Glo® Stop & Glo® гасит сигнал от люциферазы светлячка и поддерживает люминесценцию реакции люциферазы Renilla. Активность siRNA определяли путем нормализации в каждой лунке сигнала от Renilla (KLKB1) к сигналу от люциферазы светлячка (контроль). Затем оценивали величину активности siRNA относительно клеток, которые трансфицировали одним и тем же вектором, но их не обрабатывали siRNA или обрабатывали siRNA, не оказывающей целенаправленного воздействия. Все трансфекции выполняли в трех повторностях.

В табл. 5 приведены результаты скрининга в отношении однократной дозы в клетках Cos7, трансфицированных указанными iRNA для KLKB1 человека. В табл. 6 приведены результаты скрининга в отношении однократной дозы в клетках Cos7, трансфицированных указанными iRNA для KLKB1 мыши. Данные выражены в виде процента остаточной мРНК в сравнении с отрицательным контролем.

Таблица 2. Сокращения нуклеотидных мономеров, используемые в представлении последовательности нуклеиновой кислоты. Следует понимать, что эти мономеры, если они присутствуют в олигонуклеотиде, взаимно связаны собой 5'-3'-фосфодиэфирными связями

Сокращение	Нуклеотид (нуклеотиды)
A	Аденозин-3'-фосфат
Af	2'-Фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-Фтораденозин-3'-фосфоротиоат
As	Аденозин-3'-фосфоротиоат
C	Цитидин-3'-фосфат
Cf	2'-Фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-Фторцитидин-3'-фосфоротиоат
Cs	Цитидин-3'-фосфоротиоат
G	Гуанозин-3'-фосфат
Gf	2'-Фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-Фторгуанозин-3'-фосфоротиоат
Gs	Гуанозин-3'-фосфоротиоат
T	5'-Метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-Фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-Фтор-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
Ts	5-Метилуридин-3'-фосфоротиоат
U	Уридин-3'-фосфат
Uf	2'-Фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-Фторуридин-3'-фосфоротиоат
Us	Уридин-3'-фосфоротиоат
N	Любой нуклеотид (G, A, C, T или U)
a	2'-O-Метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-O-Метиладенозин-3'-фосфоротиоат
c	2'-O-Метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-O-Метилцитидин-3'-фосфоротиоат
g	2'-O-Метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-O-Метилгуанозин-3'-фосфоротиоат
t	2'-O-Метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-O-Метил-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
u	2'-O-Метилуридин-3'-фосфат
us	2'-O-Метилуридин-3'-фосфоротиоат
s	Фосфоротиоатная связь
L96	N-[трис (GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипропиол-Нур-(GalNAc-алкил)3
(dt)	Дезокситимин
Y34	2-Гидроксиметилтетрагидрофуран-4-метокси-3-фосфат (лишенная азотистого основания 2'-ОМе-фураноза)
Y44	2-Гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат
(Agn)	Аденозин-гликоль нуклеиновая кислота (GNA)
(Tgn)	Тимидин-гликоль-нуклеиновая кислота (GNA), S-изомер
(Cgn)	Цитидин-гликоль-нуклеиновая кислота (GNA)
P	Фосфат
VP	Винилфосфат

Таблица 3. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей dsRNA KLB1

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Название антисмыслового олигонуклеотида	Антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO	Position NM_000892
AD-65077	A-129940	AAUCCAAAAUUAUUCUACAAA	30	A-129941	UUUUGUAGAAUUAUUUGGAUUUC	117	1661-1682
AD-65170	A-130248	CUGGUCAUCAAAUUAAGUGCUU	31	A-130249	AAGCACUUUUUGAUGACCAGAU	118	382-403
AD-65103	A-130010	GUGGUCAUCAAAUUAAGUGCUU	32	A-130011	AAGCACUUUUUGAUGACCACAU	119	382-403
AD-65083	A-129942	CAUGGACUGGAUUUUAGAGAA	33	A-129943	UUCUCUAAAAUCCAGUCCAUGUA	120	1922-1943
AD-65087	A-130004	ACCAAAGUCGCGAGUACAUA	34	A-130005	UAUGUACUCAGCGACUUUGGUGU	121	1905-1926
AD-65149	A-130178	GAUGGACUGGAUUUUAGAGAA	35	A-130179	UUCUCUAAAAUCCAGUCCAUCUA	122	1922-1943
AD-64652	A-129275	UAUGAGAGGAGUCAUUUUAAA	36	A-129276	UUAAAAUUGACUCCUCUCAUAUC	123	431-452
AD-65162	A-130198	AAUGAGAGGAGUCAUUUUAAA	37	A-130199	UUAAAAUUGACUCCUCUCAUUUC	124	431-452
AD-65153	A-130242	UCCAAAGUCGCGAGUACAUA	38	A-130243	UAUGUACUCAGCGACUUUGGAGU	125	1905-1926
AD-65084	A-129958	AUUCUCAAAAAGGUAUUUAUU	39	A-129959	AAUUAUUUACCUUUUGUAGAAUAU	126	1671-1692
AD-65099	A-129948	UUUCUCAAAAUAAAAGAGAU	40	A-129949	AUCUCUUUUUUUUGUGAGAAAGG	127	1457-1478
AD-65100	A-129962	UAUCAAGAUUUAAAAUAACA	41	A-129963	UGUUAUUUUUAUAUCUUGAUUUC	128	1725-1746
AD-65090	A-129960	CUUCUUGAAAGAUAGUGUAAA	42	A-129961	UUAAACACUAUCUUUCAAGAAGCA	129	302-323
AD-65085	A-129972	GAAUGUUUGCCAAGAGACUUA	43	A-129973	UAAGUCUCUUGGCAACAUUCAC	130	1016-1037
AD-65062	A-129980	AUAUUCCUUUGGUAAACAAAUA	44	A-129981	UAUUUGUUUACCAAAGGAAUUAUU	131	1687-1708
AD-65164	A-130230	CGUCAUCAAAUUAAGUGCUUGA	45	A-130231	UCAAGCACUUUUUGAUGACGAC	132	384-405
AD-65139	A-130206	UCCUGCAAAAAGACUUUACCU	46	A-130207	AGGUAAGAUUCUUUUUGCAGGAUA	133	918-939
AD-65151	A-130210	CAAUGUUUGCCAAGAGACUUA	47	A-130211	UAAGUCUCUUGGCAACAUUGAC	134	1016-1037
AD-65158	A-130228	AGACACAAGCACAAUUUAUAA	48	A-130229	UUUAUUUUUGUCUUGUGUCUCC	135	1595-1616
AD-65078	A-129956	CGAGUCACAAGAAAUUGUUUA	49	A-129957	UAAACAUUUUUUGUGACUCGUA	136	818-839
AD-65161	A-130182	AUCUUGAAAGAUAGUGUUACA	50	A-130183	UGUAACACUAUCUUUCAAGAUGC	137	303-324
AD-65076	A-130016	AAUGUGGUCAUCAAAUUAAGUA	51	A-130017	UACUUAUUUGAUGACCACAUUGC	138	379-400
AD-65093	A-130006	GUUACUCUUUGAGAUUGUGUA	52	A-130007	UACACAAUCUCAAGAGUAACCA	139	1177-1198
AD-65156	A-130196	GUUCUGAAAGAUAGUGUUAAA	53	A-130197	UUAAACACUAUCUUUCAAGAACCA	140	302-323
AD-65059	A-129934	GACUUUGGAGGAGAAGAAUUA	54	A-129935	UAAUUCUUCUCCUCAAAGUCAAA	141	972-993
AD-65073	A-129968	ACCUGCAAAAAGACUUUACCU	55	A-129969	AGGUAAGAUUCUUUUUGCAGGUUA	142	918-939
AD-65074	A-129984	AUCGAGUCACAAGAAAUUGUU	56	A-129985	AACAUUUUUUGUGACUCGAUUU	143	816-837
AD-65092	A-129990	UGACACAAGCACAAUUUAUAA	57	A-129991	UUUAUUUUUGUCUUUGUGUCACC	144	1595-1616
AD-65097	A-129992	GGUCAUCAAAUUAAGUGCUUGA	58	A-129993	UCAAGCACUUUUUGAUGACCAC	145	384-405
AD-65101	A-129978	UGGUCAUCAAAUUAAGUGCUUA	59	A-129979	UAAGCACUUUUUGAUGACCACA	146	383-404
AD-65131	A-130172	AGCCAGAAAAGAUUAUCAAGAU	60	A-130173	AUCUUGAUUAUCUUUUUGGCUUU	147	1713-1734
AD-65159	A-130244	CUUACUCUUUGAGAUUGUGUA	61	A-130245	UACACAAUCUCAAGAGUAAGCA	148	1177-1198
AD-65150	A-130194	UUUCUCAAAAAGGUAUUUAUU	62	A-130195	AAUUAUUUACCUUUUGUAGAAAAU	149	1671-1692
AD-65060	A-129950	CACAAUGGAAUUGGCGUUUA	63	A-129951	UAAACGCCACAUUCCAUGUGUU	150	1827-1848
AD-65098	A-130008	UUACUCUUUGAGAUUGUGUAA	64	A-130009	UUACACAAUCUCAAGAGUAACC	151	1178-1199
AD-65067	A-129966	UACUCUUUGAGAUUGUGUAAA	65	A-129967	UUUACACAAUCUCAAGAGUAAC	152	1179-1200
AD-65065	A-129936	UGCCAGAAAAGAUUAUCAAGAU	66	A-129937	AUCUUGAUUAUCUUUUUGGCAUU	153	1713-1734
AD-65095	A-129946	UUCUUGAAAGAUAGUGUUACA	67	A-129947	UGUAACACUAUCUUUCAAGAAGC	154	303-324
AD-65126	A-130186	GACAAUGGAAUUGGCGUUUA	68	A-130187	UAAACGCCACAUUCCAUGUCUU	155	1827-1848
AD-65157	A-130212	AAUAAAAUAACCCAACGGUA	69	A-130213	UAUCCGUUGGGUUUUUUUUUAU	156	1734-1755
AD-65086	A-129988	CUUAAAACAUUCGAAAGUGGA	70	A-129989	UCCACUUUCAGAUUUUUUAAGAA	157	843-864
AD-65167	A-130200	AAUCAAGAUUAUAAAAUAACA	71	A-130201	UGUUUUUUUAUAUCUUGAUUUC	158	1725-1746
AD-65071	A-129938	AGUAACGUGGAUUCUGGAUUA	72	A-129939	UAAUCCAGAUUCCACGUUACUCA	159	618-639
AD-65066	A-129952	UAUAAAGGAGUUGAUUAGAGA	73	A-129953	UCUCAUAUCAACUCCUUUAUAAA	160	417-438
AD-65165	A-130246	AUACUCUUUGAGAUUGUGUAA	74	A-130247	UUACACAUCUCAAGAGUAUCC	161	1178-1199
AD-65132	A-130188	AAUAAAGGAGUUGAUUAGAGA	75	A-130189	UCUCAUAUCAACUCCUUUAUAAA	162	417-438
AD-65125	A-130170	CACUUUGGAGGAGAAGAAUUA	76	A-130171	UAAUUCUUCUCCUCAAAGUGAA	163	972-993
AD-65091	A-129974	UAUAAAAUAACCCAACGGUA	77	A-129975	UAUCCGUUGGGUUUUUUUAUAAU	164	1734-1755

## 045013

AD-65136	A-130252	GAAUGUGGUCAUCAAAUAGU	78	A-130253	ACUUUUUGAUGACCACAUUCCU	165	378-399
AD-65137	A-130174	UGUAACGUGGAAUCUGGAUUA	79	A-130175	UAAUCCAGAUUCCACGUUACACA	166	618-639
AD-65140	A-130222	UUCGAGUCACAAAGAAUUGUU	80	A-130223	AACAUUUUUUGUGACUCGAAUU	167	816-837
AD-65128	A-130218	UUUUUUUUUGGUUACAAAUA	81	A-130219	UUUUUUUUUACCAAGGAAUAAU	168	1687-1708
AD-65088	A-130020	ACACAAGCACAUUUUUAACCA	82	A-130021	UGGUUAAAUUUGUCUUGUGUCA	169	1597-1618
AD-65160	A-130260	CUGGAAUCUGGAUUCACUA	83	A-130261	UAGUGAGAAUCCAGAUUCCAGGU	170	624-645
AD-65152	A-130226	GUUAAAACAUUGAAAGUGGA	84	A-130227	UCCACUUUCAGAUUUUUAACAA	171	843-864
AD-65133	A-130204	AACUCUUUGAGAUUGUUAUA	85	A-130205	UUUACACAAUCUCAAGAGUUAC	172	1179-1200
AD-65082	A-130018	GCAAUGUGGUCAUCAAAUAAA	86	A-130019	UUUUUUUGAUGACCACAUUGCUU	173	377-398
AD-65094	A-130022	GUGGAAUCUGGAUUCACUA	87	A-130023	UAGUGAGAAUCCAGAUUCCAGGU	174	624-645
AD-65155	A-130180	GGCAUUGUUGGAGGACAAA	88	A-130181	UUUUUUUCCUCCACAAUGCCUG	175	1239-1260
AD-65163	A-130214	UUUGUUGGAGGAAACAAUCUCU	89	A-130215	AGAGUUUUGUUCUCCACAAAGC	176	1242-1263
AD-65144	A-130192	GGAGUCACAAGAAUUGUUUA	90	A-130193	UAAACAUUUUUUGUGACUCCA	177	818-839
AD-65096	A-129976	AUUGUUGGAGGAAACAAUCUCU	91	A-129977	AGAGUUUUGUUCUCCACAAUGC	178	1242-1263
AD-65142	A-130254	UAUGUGGUCAUCAAAUAAAGUA	92	A-130255	UACUUUUUGAUGACCACAUAGC	179	379-400
AD-65141	A-130238	CAAAAAGUUGCUUUAAGGGAA	93	A-130239	UUCCCUUACAAGCAUCUUUUGCC	180	1780-1801
AD-65079	A-129970	GUCUGUGGUGGCUUUAAGAA	94	A-129971	UUUUUUUAGCCAGCAGACCA	181	1755-1776
AD-65102	A-129994	AGCAGUUGUUAAGAAUGCCAA	95	A-129995	UUGGCAUUUUCAACACUGCUAA	182	465-486
AD-65138	A-130190	GUGUGGAGGGUACUCAUA	96	A-130191	UAUGAGUGACCCUCCACACAGU	183	1323-1344
AD-65075	A-130000	GAAAAGAUUGCUUUAAGGGAA	97	A-130001	UUCCCUUACAAGCAUCUUUCC	184	1780-1801
AD-65080	A-129986	ACAUCUGAAAGUGGCACACCA	98	A-129987	UGGUGGCCACUUUCAGAUUUU	185	849-870
AD-65145	A-130208	CUCUGUGGCUUUAUAAAGAA	99	A-130209	UUUUUUUAGCCAGCAGAGCA	186	1755-1776
AD-65169	A-130232	UGCAGUUGUUAAGAAUGCCAA	100	A-130233	UUGGCAUUUUCAACACUGCAA	187	465-486
AD-65061	A-129964	UUUUUAAAACAUUGAAAGUA	101	A-129965	UACUUUCAGAUUUUUAGAAGA	188	841-862
AD-65135	A-130236	UAGCACAUUUUUACCAACUA	102	A-130237	UAGUUGGUUAAAUUUGUCUAGU	189	1601-1622
AD-65068	A-129982	UGGAAUGUGGCGUUUGGUGGA	103	A-129983	UCCACCAAACGCCACAUUCCAUU	190	1832-1853
AD-65148	A-130256	CCAAUGUGGUCAUCAAAUAAA	104	A-130257	UUUUUUUGAUGACCACAUUGGUU	191	377-398
AD-65072	A-129954	CUGUGUGGAGGGUACUCAUA	105	A-129955	UAUGAGUGACCCUCCACACAGGU	192	1323-1344
AD-65146	A-130224	UCAUCUGAAAGUGGCACACCA	106	A-130225	UGGUGGCCACUUUCAGAUAAU	193	849-870
AD-65129	A-130234	CCACAUUUUUACCAACUGUU	107	A-130235	AACAGUUGGUUAAAUUUGGUUU	194	1603-1624
AD-65064	A-130012	CACAAGCACAUUUUUACCAA	108	A-130013	UUGGUUAAAUUUGUCUUGGUC	195	1598-1619
AD-65134	A-130220	AGGAAUGUGGCGUUUGGUGGA	109	A-130221	UCCACCAAACGCCACAUUCCUUU	196	1832-1853
AD-65063	A-129996	GCACAUUUUUACCAACUGUU	110	A-129997	AACAGUUGGUUAAAUUUGGCUU	197	1603-1624
AD-65089	A-129944	CGCAUUGUUGGAGGAAACAAA	111	A-129945	UUUUUUUCCUCCACAAUGCGUG	198	1239-1260
AD-65069	A-129998	AAGCACAUUUUUACCAACUA	112	A-129999	UAGUUGGUUAAAUUUGUCUUGU	199	1601-1622
AD-65130	A-130250	GACAAGCACAUUUUUACCAA	113	A-130251	UUGGUUAAAUUUGUCUUGUCUC	200	1598-1619
AD-65147	A-130240	UUUUUACCCGGGAGUUGACUUU	114	A-130241	AAAGUCAACUCCCGGGUAAAUUU	201	957-978
AD-65081	A-130002	AUUUACCCGGGAGUUGACUUU	115	A-130003	AAAGUCAACUCCCGGGUAAAUUU	202	957-978
AD-65154	A-130258	UCACAAGCACAUUUUUAACCA	116	A-130259	UGGUUAAAUUUGUCUUGGACA	203	1597-1618

Таблица 4. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей dsRNA KLKBI

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Название антисмыслового олигонуклеотида	Антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
AD-65077	A-129940	AfsasUfcCfaAfaAfUfAfuUfcUfaCfaAfaAfl96	204	A-129941	usUfsuUfgUfaGfaAfuauUfuUfgGfaUfususc	291
AD-65170	A-130248	CfsusGfgUfcAfuCfAfAfaUfaAfgUfgCfuUfl96	205	A-130249	asAfsGcCfaCfuUfaUfuugAfuGfaCfcAfsasu	292
AD-65103	A-130010	GfsusGfgUfcAfuCfAfAfaUfaAfgUfgCfuUfl96	206	A-130011	asAfsGcCfaCfuUfaUfuugAfuGfaCfcAfsasu	293
AD-65083	A-129942	CfsasUfgGfaCfuGfGfAfuUfuUfaGfaGfaAfl96	207	A-129943	usUfscUfcUfaAfaAfuccAfgUfcCfaUfgsusa	294
AD-65087	A-130004	AfscsCfaAfaGfuCfGfCfuGfaGfuAfcAfuAfl96	208	A-130005	usAfsuGfuAfcUfcAfgGcAfcUfuUfgGfusgsu	295
AD-65149	A-130178	GfsasUfgGfaCfuGfGfAfuUfuUfaGfaGfaAfl96	209	A-130179	usUfscUfcUfaAfaAfuccAfgUfcCfaUfcsusa	296
AD-64652	A-129275	UfsasUfgAfgAfgGfAfgGfAfuUfuUfaAfl96	210	A-129276	usUfsaAfaAfuUfgAfcuccCfuCfuUfasusc	297
AD-65162	A-130198	AfsasUfgAfgAfgGfAfgGfAfuUfuUfaAfl96	211	A-130199	usUfsaAfaAfuUfgAfcuccCfuCfuUfasusc	298
AD-65153	A-130242	UfscsCfaAfaGfuCfGfCfuGfaGfuAfcAfuAfl96	212	A-130243	usAfsuGfuAfcUfcAfgGcAfcUfuUfgGfasgsu	299
AD-65084	A-129958	AfsusUfcUfaCfaAfaAfaAfgGfuAfaAfuAfl96	213	A-129959	asAfsuAfuUfaUfaUfuUfgAfcCfuUfaCfaUfasasu	300
AD-65099	A-129948	UfsusUfcUfcAfaAfaAfaAfaAfaGfaGfaUfl96	214	A-129949	asUfscUfcUfuUfuUfuUfuUfgGfaGfaAfasgsg	301
AD-65100	A-129962	UfsasUfcAfaGfaUfUfAfaUfaAfaUfaAfcAfl96	215	A-129963	usGfsuUfaUfuUfaUfaUfaUfcUfuUfasusc	302
AD-65090	A-129960	CfsusUfcUfuGfaAfaAfgGfAfuUfaUfaAfl96	216	A-129961	usUfsaAfcAfcUfaUfcuuCfaAfaGfaAfgscsa	303
AD-65085	A-129972	GfsasAfuGfuUfuUfcCfaAfgAfgAfcUfuAfl96	217	A-129973	usAfsaGfuCfuUfuUfgGcAfaAfcUfuUfcsasc	304
AD-65062	A-129980	AfsusAfuUfcCfuUfuUfgGfGfAfaAfaAfl96	218	A-129981	usAfsuUfuGfuUfaCfcaaAfgGfaAfuUfususu	305
AD-65164	A-130230	CfsgsUfcAfuCfaAfaAfaAfgUfgCfuUfaAfl96	219	A-130231	usCfsaAfgCfaCfuUfaUfuUfgAfcCfaUfgscsc	306
AD-65139	A-130206	UfscsCfuGfcAfaAfaAfgAfcUfuUfaCfcUfl96	220	A-130207	asGfsgUfaAfaGfuUfcuuUfuUfgAfgGfasusa	307
AD-65151	A-130210	CfsasAfuGfuUfuUfcCfaAfgAfgAfcUfuAfl96	221	A-130211	usAfsaGfuCfuUfuUfgGcAfaAfcUfuUfgsasc	308
AD-65158	A-130228	AfsgsAfcAfaAfaGfCfAfaAfaUfuUfaAfl96	222	A-130229	usUfsaUfaAfaUfuUfgGfcUfuUfuUfcUfcsusc	309
AD-65078	A-129956	CfsgsAfgUfcAfaAfaAfgAfaAfuGfuUfaAfl96	223	A-129957	usAfsaAfcAfuUfuUfuUfuUfgGfaCfuCfsgasu	310
AD-65161	A-130182	AfsusCfuUfgAfaAfaAfgAfaAfuUfuUfaAfl96	224	A-130183	usGfsuAfaCfaCfuUfuUfuUfaAfaUfususc	311
AD-65076	A-130016	AfsasUfgUfgGfuCfaAfaAfaAfaAfaAfl96	225	A-130017	usAfsuUfuUfuUfuUfgGfaAfcCfaUfgscsc	312
AD-65093	A-130006	GfsusUfaCfuCfuUfuUfgGfaGfaUfuGfuUfaAfl96	226	A-130007	usAfsuAfcAfaUfcUfaAfaAfgUfaAfcscsa	313
AD-65156	A-130196	GfsusUfcUfuGfaAfaAfgGfAfuUfaUfaAfl96	227	A-130197	usUfsaAfcAfcUfaUfcuuCfaAfaGfaAfcscsa	314
AD-65059	A-129934	GfsasCfuUfuGfgAfgGfGfaGfaAfaUfaAfl96	228	A-129935	usAfsaUfuCfuUfcUfcuuCfaAfaAfgUfcsasa	315
AD-65073	A-129968	AfscsCfuGfcAfaAfaAfgAfcUfuUfaCfcUfl96	229	A-129969	asGfsgUfaAfaGfuUfcuuUfuUfgAfgGfususa	316
AD-65074	A-129984	AfsusCfGfAfgUfcAfaAfaAfgAfaAfuGfuUfl96	230	A-129985	asAfsaAfuUfuUfuUfuUfgGfaCfuCfGfAfususu	317
AD-65092	A-129990	UfsgsAfaCfaAfaGfCfAfaAfaUfuUfaAfl96	231	A-129991	usUfsaUfaAfaUfuUfgGfcUfuUfuUfgGfCfasusc	318
AD-65097	A-129992	GfsgsUfcAfuCfaAfaAfaAfgUfgCfuUfaAfl96	232	A-129993	usCfsaAfgCfaCfuUfaUfuUfgAfgGfCfasusc	319
AD-65101	A-129978	UfsgsGfuCfaUfaAfaAfaAfaAfuGfcUfaAfl96	233	A-129979	usAfsaGfcAfcUfuUfuUfuUfgAfgAfcCfasusc	320
AD-65131	A-130172	AfsgsCfcAfgAfaAfaAfgGfAfuUfaAfaAfl96	234	A-130173	asUfscUfuGfaUfaUfcuuUfuUfuUfgGfCfususu	321
AD-65159	A-130244	CfsusUfaCfuCfuUfuUfgGfaGfaUfuGfuUfaAfl96	235	A-130245	usAfsuAfcAfaUfcUfaAfaAfgUfaAfgscsa	322
AD-65150	A-130194	UfsusUfcUfaCfaAfaAfaAfgGfuAfaAfuUfl96	236	A-130195	asAfsuAfuUfuUfaAfcCfuUfuUfgGfaAfasasu	323
AD-65060	A-129950	CfsasCfaAfuGfgAfaAfaAfgUfgGfcGfuUfaAfl96	237	A-129951	usAfsaAfcGfcCfaCfaUfuUfuUfgGfUfgscsc	324
AD-65098	A-130008	UfsusAfcUfcUfuUfgGfAfgAfuUfgUfgUfaAfl96	238	A-130009	usUfsaCfaCfaAfuCfuAfaGfaGfuAfasusc	325
AD-65067	A-129966	UfsasCfuCfuUfuUfgAfgGfAfuUfuUfaAfl96	239	A-129967	usUfsuAfcAfcAfaUfcuuCfaAfaAfgUfasusc	326
AD-65065	A-129936	UfsgsCfcAfgAfaAfaAfgGfAfuUfaAfaAfl96	240	A-129937	asUfscUfuGfaUfaUfcuuUfuUfuUfgGfCfasusu	327
AD-65095	A-129946	UfsusCfuUfgAfaAfaAfgAfuUfgUfuAfcAfl96	241	A-129947	usGfsuAfaCfaCfuAfcuuUfuUfaAfgAfasgsc	328
AD-65126	A-130186	GfsasCfaAfuGfgAfaAfaAfgUfgGfcGfuUfaAfl96	242	A-130187	usAfsaAfcGfcCfaCfaUfuUfuUfgUfcsusu	329
AD-65157	A-130212	AfsasUfaAfaAfaAfaAfcCfaAfcGfgAfuAfl96	243	A-130213	usAfsuAfcGfuUfgGfguuAfuUfuUfaUfasasu	330
AD-65086	A-129988	CfsusUfaAfaAfaAfaAfcUfcGfaAfaGfuGfgAfl96	244	A-129989	usCfsaAfcUfuUfcAfgAfuUfuUfaAfgsasa	331
AD-65167	A-130200	AfsasUfcAfaGfaUfUfAfaAfaAfaAfaAfl96	245	A-130201	usGfsuUfaUfuUfaUfaUfaUfcUfuUfasusc	332
AD-65071	A-129938	AfsgsUfaAfaGfgGfGfAfuUfcUfgGfaUfaAfl96	246	A-129939	usAfsaUfcCfaGfaUfcuuAfcGfuUfaCfususc	333
AD-65066	A-129952	UfsasUfaAfaGfgAfgUfuUfaUfaUfgAfgAfl96	247	A-129953	usCfsuCfaUfaUfcAfaCfcUfuUfaUfasasa	334
AD-65165	A-130246	AfsusAfcUfcUfuUfgGfAfgAfuUfgUfgUfaAfl96	248	A-130247	usUfsaCfaCfaAfuCfuAfaGfaGfuAfususc	335
AD-65132	A-130188	AfsasUfaAfaGfgAfgUfuUfgGfAfuUfgAfgAfl96	249	A-130189	usCfsuAfaUfaUfcAfaCfcUfuUfaUfasasa	336
AD-65125	A-130170	CfsasCfuUfuGfgAfgGfGfaGfaAfaUfaAfl96	250	A-130171	usAfsaUfuCfuUfcUfcuuCfaAfaAfgUfgsasa	337
AD-65091	A-129974	UfsasUfaAfaAfaAfaAfcCfaAfcGfgAfuAfl96	251	A-129975	usAfsuAfcGfuUfgGfguuAfuUfuUfaUfasasu	338
AD-65136	A-130252	GfsasAfuGfuGfgUfcAfaAfaAfaAfaAfl96	252	A-130253	asCfsuUfaUfuUfgAfgAfcAfcAfuUfcsusc	339
AD-65137	A-130174	UfsgsUfaAfaGfgGfGfAfuUfcUfgGfaUfaAfl96	253	A-130175	usAfsaUfcCfaGfaUfcuuAfcGfuUfaCfasusc	340
AD-65140	A-130222	UfsusCfGfAfgUfcAfaAfaAfgAfaAfuUfl96	254	A-130223	asAfsaAfuUfuUfuUfuUfgGfaCfuCfGfAfasusu	341
AD-65128	A-130218	UfsusAfuUfcCfuUfuUfgGfGfAfaAfaAfl96	255	A-130219	usAfsuUfuGfuUfaCfcaaAfgGfaAfaUfasusu	342
AD-65088	A-130020	AfscsAfcAfaGfcAfaAfaAfaUfaUfaCfcAfl96	256	A-130021	usGfsgUfaUfaAfaUfuUfgGfcUfuUfgGfususc	343
AD-65160	A-130260	CfsusGfgAfaUfcUfgGfGfAfuUfcUfaCfaAfl96	257	A-130261	usAfsuUfgAfgAfaUfcAfaGfaUfuCfaAfgsgsu	344

AD-65152	A-130226	GfsusUfaAfaAfcAfUfCfuGfaAfaGfuGfgAfl96	258	A-130227	usCfscAfcUfuUfcAfgauGfuUfuUfaAfcasasa	345
AD-65133	A-130204	AfsasCfuCfuUfuGfAfgGfaUfuGfuGfaAfaAfl96	259	A-130205	usUfsuAfcAfcAfaUfcuAfaAfgAfgUfusasc	346
AD-65082	A-130018	GfscsAfaUfgUfgGfUfCfaUfcAfaAfaAfl96	260	A-130019	usUfsuAfuUfuGfaUfgacCfaCfaUfuGfcsusu	347
AD-65094	A-130022	GfsusGfgAfaUfcUfgGfGfaUfuCfuCfaAfl96	261	A-130023	usAfgUfgAfgAfaUfccAfaUfuCfcAfcsgsu	348
AD-65155	A-130180	GfsgsCfaUfuGfuUfgGfGfaGfgAfaCfaAfaAfl96	262	A-130181	usUfsuUfgUfuCfcUfccAfcAfaUfgCfcusug	349
AD-65163	A-130214	UfsusUfgUfuGfgAfgGfGfaAfcAfaAfcUfcUfl96	263	A-130215	asGfsaGfuUfuGfuUfccuCfcAfaCfaAfasgsc	350
AD-65144	A-130192	GfsgsAfgUfcAfcAfaAfaAfaAfuGfuUfuAfl96	264	A-130193	usAfsaAfcAfuUfuCfuuuGfuGfaCfuCfcasasu	351
AD-65096	A-129976	AfsusUfgUfuGfgAfgGfGfaAfcAfaAfcUfcUfl96	265	A-129977	asGfsaGfuUfuGfuUfccuCfcAfaCfaAfusgsc	352
AD-65142	A-130254	UfsasUfgUfgGfuCfaUfcAfaAfaAfaAfl96	266	A-130255	usAfsuUfuUfuGfaUfgacCfaCfaUfasgsc	353
AD-65141	A-130238	CfsasAfaAfgAfuGfcUfuGfuAfaGfgGfaAfl96	267	A-130239	usUfscCfcUfuAfcAfgcAfuCfuUfuUfgscsc	354
AD-65079	A-129970	GfsusCfuGfuGfcUfgGfGfaUfaAfaGfaAfl96	268	A-129971	usUfscUfuUfaUfaGfccAfcAfcAfcscsa	355
AD-65102	A-129994	AfsgsCfaGfuGfuUfgGfAfaGfaAfuGfcCfaAfl96	269	A-129995	usUfsgGfcAfuUfcUfuccAfcAfcUfgCfusasa	356
AD-65138	A-130190	GfsusGfuGfuGfgAfgGfGfuUfcAfcUfcAfaAfl96	270	A-130191	usAfsuGfaGfuGfaCfccuCfcAfcAfcAfcsgsu	357
AD-65075	A-130000	GfsasAfaAfgAfuGfcUfuGfuAfaGfgGfaAfl96	271	A-130001	usUfscCfcUfuAfcAfgcAfuCfuUfuUfscsc	358
AD-65080	A-129986	AfscsAfuCfuGfaAfaAfgGfuGfgCfaCfaCfaAfl96	272	A-129987	usGfsgUfgUfgCfcAfcuuUfcAfgAfgUfususu	359
AD-65145	A-130208	CfsusCfuGfuGfcUfgGfGfaUfaAfaGfaAfl96	273	A-130209	usUfscUfuUfaUfaGfccAfcAfcAfgAfgscsa	360
AD-65169	A-130232	UfsgsCfaGfuGfuUfgGfAfaGfaAfuGfcCfaAfl96	274	A-130233	usUfsgGfcAfuUfcUfuccAfcAfcUfgCfasasa	361
AD-65061	A-129964	UfsusCfuUfaAfaAfcAfaUfcUfuGfaAfaGfaAfl96	275	A-129965	usAfsuUfuUfcAfgAfgUfuUfaAfgAfasgsa	362
AD-65135	A-130236	UfsasGfcAfcAfaUfuUfaUfaCfcAfaCfaAfl96	276	A-130237	usAfgUfuGfgUfaUfaaaUfuGfuGfcUfasgsu	363
AD-65068	A-129982	UfsgsGfaAfuGfuGfgGfCfuUfuUfgGfuGfgAfl96	277	A-129983	usCfscAfcCfaAfaCfcccAfcAfuUfcCfasusu	364
AD-65148	A-130256	CfscsAfaUfgUfgGfUfCfaUfcAfaAfaAfl96	278	A-130257	usUfsuAfuUfuGfaUfgacCfaCfaUfuGfcsusu	365
AD-65072	A-129954	CfsusGfuGfuGfgAfgGfGfuUfcAfcUfcAfaAfl96	279	A-129955	usAfsuGfaGfuGfaCfccuCfcAfcAfcAfgsgsu	366
AD-65146	A-130224	UfscsAfuCfuGfaAfaAfgGfuGfgCfaCfaCfaAfl96	280	A-130225	usGfsgUfgUfgCfcAfcuuUfcAfgAfgUfasusu	367
AD-65129	A-130234	CfscsAfcAfaUfuUfaUfaCfcAfaCfuGfuUfl96	281	A-130235	asAfsaAfgUfuGfgUfaaaAfaUfuGfuGfcsusu	368
AD-65064	A-130012	CfsasCfaAfgCfaCfaAfaUfuUfaAfcCfaAfl96	282	A-130013	usUfsgGfuAfaAfaAfuugUfgCfuUfgUfgsusc	369
AD-65134	A-130220	AfsgsGfaAfuGfuGfgGfCfuUfuUfgGfuGfgAfl96	283	A-130221	usCfscAfcCfaAfaCfcccAfcAfuUfcCfususu	370
AD-65063	A-129996	GfscsAfcAfaUfuUfaUfaCfcAfaCfuGfuUfl96	284	A-129997	asAfsaAfgUfuGfgUfaaaAfaUfuGfuGfcsusu	371
AD-65089	A-129944	CfsgsCfaUfuGfuUfgGfGfaGfgAfaCfaAfaAfl96	285	A-129945	usUfsuUfgUfuCfcUfccAfcAfaUfgCfcusug	372
AD-65069	A-129998	AfsasGfcAfcAfaUfuUfaUfaCfcAfaCfaAfl96	286	A-129999	usAfgUfuGfgUfaUfaaaUfuGfuGfcUfusgsu	373
AD-65130	A-130250	GfsasCfaAfgCfaCfaAfaUfuUfaAfcCfaAfl96	287	A-130251	usUfsgGfuAfaAfaAfuugUfgCfuUfgUfcsusc	374
AD-65147	A-130240	UfsusUfuAfcCfcGfGfGfaGfuUfgAfcUfuUfl96	288	A-130241	asAfsaGfuCfaAfcUfccGfgGfuAfaAfasusu	375
AD-65081	A-130002	AfsusUfuAfcCfcGfGfGfaGfuUfgAfcUfuUfl96	289	A-130003	asAfsaGfuCfaAfcUfccGfgGfuAfaAfasusu	376
AD-65154	A-130258	UfscsAfcAfaGfcAfcAfaUfuUfaUfaCfcAfl96	290	A-130259	usGfsgUfaUfaAfaUfuguGfcUfuGfuGfascsa	377

Таблица 5. Скрининг в отношении однократной дозы для KLKB1 человека с помощью анализа с использованием системы Dual-Glo Luciferase®

ID дуплекса	10 нМ, средн.	0,1 нМ, средн.	10 нМ, станд. отклон.	0,1 нМ, станд. отклон.
AD-65077	15,04	36,85	1,97	0,94
AD-65170	11,72	37,36	1,61	3,43
AD-65103	11,77	40,29	1,72	2,58
AD-65083	14,90	46,32	1,64	3,59
AD-65087	14,83	47,05	0,93	3,15
AD-65149	15,68	47,95	1,10	5,95
AD-64652	17,40	48,15	0,98	2,10
AD-65162	20,26	48,59	0,11	6,03
AD-65153	13,45	49,10	0,80	3,51
AD-65084	16,25	49,14	1,79	4,63
AD-65099	14,44	49,82	2,09	1,40
AD-65100	19,10	50,71	0,37	1,49
AD-65090	18,90	50,81	1,95	7,82
AD-65085	15,98	52,77	0,74	3,97
AD-65062	16,20	54,87	0,06	3,28
AD-65164	14,22	55,83	0,13	5,41
AD-65139	14,30	56,04	0,82	4,47
AD-65151	15,78	56,12	2,34	8,24
AD-65158	22,09	56,30	2,11	4,24
AD-65078	16,43	56,83	2,21	4,52
AD-65161	20,86	56,93	1,98	2,35
AD-65076	15,06	57,79	1,13	3,90
AD-65093	18,51	58,48	1,65	2,72
AD-65156	21,88	58,48	1,23	5,06
AD-65059	23,66	59,20	2,39	9,41
AD-65073	14,96	59,62	0,84	4,37
AD-65074	20,38	59,64	1,70	4,26
AD-65092	25,49	59,65	1,13	5,25
AD-65097	16,10	59,84	1,05	6,04

045013

AD-65101	17,79	60,00	1,09	7,50
AD-65131	26,32	60,83	3,13	4,22
AD-65159	20,30	60,84	1,29	5,93
AD-65150	26,14	60,87	2,74	5,87
AD-65060	21,85	61,24	2,64	8,69
AD-65098	21,82	61,42	1,59	2,06
AD-65067	14,78	61,63	1,49	1,15
AD-65065	30,49	61,91	1,08	3,88
AD-65095	20,31	62,19	0,93	3,55
AD-65126	22,68	62,58	2,00	3,65
AD-65157	37,47	63,14	1,23	3,92
AD-65086	32,28	63,19	2,00	6,01
AD-65167	26,43	63,54	1,61	3,80
AD-65071	26,58	64,16	2,30	2,64
AD-65066	22,13	64,20	1,26	3,77
AD-65165	21,89	64,31	2,14	3,57
AD-65132	21,03	64,52	2,67	2,21
AD-65125	25,73	64,78	3,64	10,30
AD-65091	35,66	65,28	3,85	0,92
AD-65136	19,19	65,74	1,46	2,65
AD-65137	28,04	65,76	1,12	4,54
AD-65140	27,71	65,90	2,52	2,03
AD-65128	24,33	66,14	3,88	6,36
AD-65088	38,37	66,28	0,75	4,58
AD-65160	25,02	66,42	1,10	2,11
AD-65152	48,65	66,46	2,84	2,02
AD-65133	14,03	66,60	1,79	1,76
AD-65082	28,29	66,66	3,48	4,83
AD-65094	26,65	66,78	0,56	1,41
AD-65155	40,50	66,99	2,70	1,23
AD-65163	35,04	67,16	3,15	4,42
AD-65144	22,23	67,27	1,79	0,87
AD-65096	36,47	67,31	2,64	1,97
AD-65142	19,07	67,32	3,01	1,34

## 045013

AD-65141	15,21	67,58	1,60	3,45
AD-65079	29,27	67,76	2,80	3,80
AD-65102	30,46	68,54	2,45	1,65
AD-65138	41,51	68,68	2,13	5,34
AD-65075	16,72	69,00	1,04	1,14
AD-65080	36,41	69,03	4,21	3,96
AD-65145	34,78	69,34	2,61	2,95
AD-65169	30,06	69,63	2,17	4,29
AD-65061	41,00	70,18	4,34	3,71
AD-65135	67,86	70,58	2,28	5,97
AD-65068	30,14	71,51	3,78	4,08
AD-65148	37,81	71,67	7,51	2,54
AD-65072	43,46	71,73	1,45	6,71
AD-65146	55,99	71,80	5,50	3,07
AD-65129	34,09	71,81	1,22	2,86
AD-65064	37,23	71,84	4,61	2,50
AD-65134	34,90	71,86	3,14	2,91
AD-65063	32,52	72,21	2,92	4,47
AD-65089	34,88	73,21	0,07	0,46
AD-65069	59,34	73,27	4,47	4,89
AD-65130	38,52	73,89	1,69	2,78
AD-65147	69,27	76,69	7,33	4,28
AD-65081	55,75	77,78	4,77	5,96
AD-65154	45,69	79,81	2,01	7,82

Таблица 6. Скрининг в отношении однократной дозы для KLKB1 мыши с помощью анализа с использованием системы Dual-Glo Luciferase®

ID дуплекса	10 нМ, средн.	0,1 нМ, средн.	10 нМ, станд. отклон.	0,1 нМ, станд. отклон.
AD-65077	8,67	44,09	0,45	0,12
AD-65103	13,99	52,56	1,01	0,70
AD-65087	11,03	55,15	0,53	0,44
AD-65101	18,50	57,32	1,40	5,05
AD-65151	13,94	58,04	0,90	1,91

## 045013

AD-65097	17,04	58,72	1,99	3,06
AD-65170	25,69	59,35	1,72	3,72
AD-65062	32,25	60,50	3,49	0,75
AD-65064	34,48	61,67	1,44	0,10
AD-65085	13,68	61,86	1,70	3,87
AD-65063	17,43	61,92	1,12	2,56
AD-65153	23,75	62,67	2,17	2,36
AD-65089	30,93	62,79	0,75	2,15
AD-65074	43,09	63,07	1,73	4,37
AD-65067	18,02	63,49	2,41	2,86
AD-65099	48,62	63,58	2,12	4,44
AD-65091	67,51	64,14	8,48	2,38
AD-65086	41,17	64,14	4,31	2,61
AD-65059	75,31	64,20	2,59	3,27
AD-65158	59,18	64,32	3,51	2,00
AD-65095	65,59	64,35	6,12	5,81
AD-65083	32,77	64,54	1,99	3,38
AD-65169	66,29	64,54	3,45	4,37
AD-65125	71,21	64,58	3,75	2,19
AD-65141	34,27	64,65	2,11	5,10
AD-65073	47,93	64,68	2,48	1,94
AD-65142	49,73	64,74	4,36	5,42
AD-65128	37,04	64,86	3,14	0,92
AD-65075	34,53	65,38	3,98	1,48
AD-65068	75,01	65,42	1,57	3,56
AD-65148	54,43	65,52	3,04	1,57
AD-65065	110,49	65,55	4,29	2,79
AD-65071	54,17	65,62	3,09	2,92
AD-65061	112,26	65,87	2,27	2,26
AD-65060	63,69	65,90	5,04	0,97
AD-65076	27,86	65,98	2,99	3,32
AD-65098	51,86	66,08	3,95	6,10
AD-64652	70,91	66,42	5,35	3,70
AD-65154	65,58	66,44	3,77	1,79

## 045013

AD-65131	104,49	66,84	3,11	3,42
AD-65152	46,64	66,91	2,11	2,46
AD-65160	18,79	67,16	0,67	4,48
AD-65133	23,73	67,16	1,62	3,56
AD-65096	55,79	67,18	3,11	4,26
AD-65163	62,97	67,20	4,28	0,88
AD-65157	66,01	67,22	4,10	3,60
AD-65092	51,19	67,53	3,56	1,95
AD-65093	52,08	67,55	2,16	1,72
AD-65130	57,52	67,76	6,66	1,12
AD-65100	74,97	67,91	6,18	2,73
AD-65102	63,88	67,94	2,90	2,22
AD-65159	59,98	67,94	6,46	4,35
AD-65165	62,31	67,95	1,86	3,06
AD-65150	81,30	68,12	8,66	0,38
AD-65164	34,95	68,44	0,63	3,58
AD-65136	50,50	68,53	3,84	0,44
AD-65161	71,46	68,64	3,85	1,88
AD-65088	48,15	68,68	3,38	1,80
AD-65134	68,99	68,91	2,75	1,56
AD-65078	63,09	69,05	4,57	3,85
AD-65129	18,28	69,24	1,92	0,72
AD-65155	45,01	69,32	3,93	1,78
AD-65079	47,09	69,38	0,79	3,42
AD-65126	67,47	69,39	3,54	7,01
AD-65144	65,85	69,71	2,58	4,73
AD-65084	81,65	69,74	4,96	3,77
AD-65162	74,13	69,80	5,71	3,24
AD-65140	54,32	69,81	1,87	3,84
AD-65139	46,64	69,97	6,00	2,50
AD-65147	66,48	69,99	4,21	3,72
AD-65069	67,61	70,00	2,85	2,74
AD-65149	45,54	70,01	2,63	2,08
AD-65072	73,76	70,21	3,59	1,93
AD-65146	79,06	70,25	5,25	2,65
AD-65145	41,44	70,43	1,00	3,89
AD-65132	72,39	70,57	2,20	1,67
AD-65090	112,31	70,73	6,67	2,16
AD-65094	35,82	70,81	2,77	0,09
AD-65066	75,47	70,83	3,28	4,93
AD-65137	57,80	71,08	2,54	3,10
AD-65081	62,66	71,12	4,17	6,09
AD-65082	42,77	71,30	1,68	1,58
AD-65138	72,87	71,49	1,82	2,34
AD-65080	68,06	72,17	3,20	0,58
AD-65167	73,30	72,47	5,89	3,39
AD-65135	76,47	72,83	0,50	2,14
AD-65156	104,49	73,62	4,93	2,80
AD-65077	15,04	36,85	1,97	0,94
AD-65170	11,72	37,36	1,61	3,43
AD-65103	11,77	40,29	1,72	2,58

Набор дуплексов также анализировали в отношении дозозависимого эффекта в отношении сайленсинга мРНК KLKB1 человека и KLKB1 мыши с помощью анализа с использованием системы люцифераз Dual-Glo®, описанного выше. Результаты скрининга в отношении KLKB1 человека на клетках Cos7, трансфицированных указанными iRNA для KLKB1, показаны в табл. 7. Результаты скрининга в отноше-

нии KLKB1 мыши на клетках Cos7, трансфицированных указанными iRNA для KLKB1, показаны в табл. 8. Данные выражены в виде процента остаточной мРНК в сравнении с отрицательным контролем через 48 ч.

Таблица 7. Скрининг в отношении дозозависимого эффекта для KLKB1 человека на клетках Cos7 с применением анализа с использованием системы Dual-Glo Luciferase®

ID дуплекса	IC50 (нМ)
AD-65077	0,0004
AD-65170	0,0084
AD-65103	0,0344
AD-65083	0,0704
AD-65087	0,0593
AD-65149	0,0854
AD-64652	0,123
AD-65162	0,1323
AD-65153	0,0683
AD-65084	0,0987
AD-65099	0,0211

Таблица 8. Скрининг в отношении дозозависимого эффекта для KLKB1 мыши на клетках Cos7 с применением анализа с использованием системы Dual-Glo Luciferase®

ID дуплекса	IC50 (нМ)
AD-65077	0,0083
AD-65170	0,206
AD-65103	0,1216
AD-65083	1,2257
AD-65087	0,1381
AD-65149	36,5482
AD-64652	нет данных
AD-65162	нет данных
AD-65153	0,4234
AD-65084	нет данных
AD-65099	246,7682

с. Пример 3. Синтез iRNA F12.

i. Источники получения реагентов.

Если источник получения реагента конкретно не приведен в данном документе, такой реагент можно приобрести у любого поставщика реагентов для использования в молекулярной биологии со стандартными качеством/чистотой для применения в молекулярной биологии.

Транскрипты.

Конструирование siRNA.

Набор siRNA, целенаправленно воздействующих на F12 человека, "фактор свертывания крови XII" (человек: ID эталонной последовательности в NCBI NM\_000505; ID гена в NCBI:2161), а также на ортологи F12 в исследованиях видовой токсичности (яванский макак: XM\_005558647; мышь: NM\_021489; крыса, NM\_001014006) были сконструированы с помощью специально разработанных скриптов на языке R и Python. Эталонная последовательность мРНК F12 человека имеет длину 2060 оснований. Логическое обоснование и способ применения набора конструкций siRNA заключались в следующем: прогнозируемую эффективность для каждой потенциальной 19-мерной siRNA от положения 50 до положения 2060 включительно (кодирующий участок и 3'-UTR) мРНК F12 человека (содержащей кодирующий участок и 3'-UTR) определяли с помощью линейной модели, с помощью которой прогнозировали непосредственный показатель нокдауна мРНК, исходя из данных по более чем 20000 различных конструкций siRNA, целенаправленно воздействующих на большое количество генов позвоночных. Поднаборы siRNA для F12 конструировали с идеальными или почти идеальными совпадениями между человеком, яванским макаком и макаком-резусом. Дополнительный поднабор конструировали с идеальными или почти идеальными совпадениями с ортологами F12 мыши или крысы. Для каждой нити siRNA в полном переборе использовали сделанный по индивидуальному заказу скрипт на языке Python для измерения количества и определения положений ошибок спаривания между siRNA и всеми потенциальными выравниваниями в

транскриптом целевого вида. Дополнительные баллы присваивали за ошибки спаривания в затравочном участке, определенном в данном случае как положения 2-9 антисмыслового олигонуклеотида, равно как и в сайте расщепления siRNA, определенном в данном случае как положения 10-11 антисмыслового олигонуклеотида.

Относительные баллы за ошибки спаривания составляли 2,8 для ошибок спаривания в затравочном участке, 1,2 для ошибок спаривания в сайте расщепления и 1 для ошибок спаривания в других положениях вплоть до положения 19 антисмыслового олигонуклеотида. Ошибки спаривания в первом положении игнорировали. Балл за специфичность рассчитывали для каждой нити путем суммирования значений каждой взвешенной ошибки спаривания. Предпочтение отдавали тем siRNA, "антисмысловой" балл которых для человека и макака-крабоеда составлял  $\geq 3,0$ , и прогнозируемая эффективность представляла собой  $\geq 70\%$  нокдаун транскрипта F12.

Подробный перечень немодифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей F12 показан в табл. 9. Подробный перечень модифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей F12 показан в табл. 10.

#### Синтез siRNA.

Последовательности siRNA для F12 синтезировали в масштабе 1 мкмоль на синтезаторе Mermade 192 (BioAutomation) с применением фосфорамидитной химии, используя твердую подложку. Твердая подложка представляла собой стеклянную подложку с заданным размером пор (500 Å), нагруженную созданным по индивидуальному заказу лигандом GalNAc, или универсальную твердую подложку (AM biochemical). Вспомогательные реагенты для синтеза, 2'-F- и 2'-O-метил-PHK и дезоксо-фосфорамидиты, получали от Thermo-Fisher (Милуоки, Висконсин) и HONGGENE (Китай). 2' F, 2'-O-метил, GNA (гликоль-нуклеиновые кислоты), 5'-фосфат и другие модификации вводили с использованием соответствующих фосфорамидитов. Синтез отдельных нитей, конъюгированных с GalNAc по 3'-концу, выполняли на модифицированной GalNAc CPG-подложке. Сделанную по индивидуальному заказу универсальную твердую CPG-подложку использовали для синтеза отдельных антисмысловых нитей. Время связывания для всех фосфорамидитов (100 мМ в ацетонитриле) составляло 5 мин при использовании 5-этилтио-1Н-тетразола (ETT) в качестве активатора (0,6М в ацетонитриле). Фосфоротиоатные связи получали с использованием 50 мМ раствора 3-((диметиламинометилиден)амино)-3Н-1,2,4-дитиазол-3-тиона (DDTT, получали от Chemgenes (Уилмингтон, Массачусетс, США)) в безводном ацетонитриле/пиридине (1:1 объем/объем). Время окисления составляло 3 мин. Все последовательности синтезировали с удалением в конечном итоге группы DMT ("без DMT").

По завершении твердофазного синтеза олигорибонуклеотиды отщепляли от твердой подложки и с них снимали защитную группу в запечатанных планшетах с 96 глубокими лунками с использованием 200 мкл реагента в виде водного метиламина при 60°C в течение 20 мин. Для последовательностей, содержащих 2'-рибозные остатки (2'-ОН), которые были защищены группой трет-бутилдиметилсилила (TBDMS), вторую стадию снятия защиты выполняли с применением реагента TEA·3HF (триэтиламина тригидрофторида). В раствор метиламина для удаления защитных групп добавляли 200 мкл диметилсульфоксида (DMSO) и 300 мкл реагента TEA. Добавляли реагент 3HF и раствор инкубировали в течение дополнительных 20 мин при 60°C. В конце стадии отщепления и удаления защитных групп планшету для синтеза давали достичь комнатной температуры и в нем проводили осаждение путем добавления 1 мл смеси ацетонитрил:этанол (9:1). Планшеты охлаждали при -80°C в течение 2 ч и супернатант аккуратно удаляли при помощи многоканальной пипетки. Осадок с олигонуклеотидами ресуспендировали в 20 мМ буфера NaOAc и обессоливали с использованием 5 мл колонки для эксклюзионной хроматографии Hi-Trap (GE Healthcare) на "AKTA Purifier System", оснащенной устройством автоматической подачи образцов A905 и коллектором фракций Frac 950. Обессоленные образцы собирали в 96-луночные планшеты. Образцы из каждой последовательности анализировали при помощи LC-MS для подтверждения идентичности, УФ (260 нм) для количественного определения, а выбранный набор образцов анализировали при помощи ИЭХ-хроматографии для определения чистоты.

Отжиг отдельных нитей F12 осуществляли на автоматическом устройстве Tecan для манипуляции с жидкостями. Эквимолярную смесь смысловых и антисмысловых отдельных нитей объединяли и гибридизовали в 96-луночных планшетах. После объединения отдельных комплементарных нитей 96-луночный планшет плотно запечатывали и нагревали в печи при 100°C в течение 10 мин и позволяли ему медленно достичь комнатной температуры за период 2-3 ч. Концентрацию каждого дуплекса нормализовали к 10 мкМ в IX PBS и затем подвергали скрининговому анализу *in vitro*.

Таблица 9. Немодифицированные последовательности F12

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Название антисмыслового олигонуклеотида	Антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	Положение в NM_000505	SEQ ID NO:
AD-66186	A-132464	GGUGAGCUUGGAGUCAACACU	378	A-132465	AGUGUUGACUCCAAGCUCACCAG	79_102	428
AD-66157	A-132406	GAGCUUGGAGUCAACACUUUA	379	A-132407	UAAAGUGUUGACUCCAAGCUCAC	82_105	429
AD-66118	A-132326	CUUGGAGUCAACACUUUCGAU	380	A-132327	AUCGAAAGUGUUGACUCCAAGCU	85_108	430
AD-66115	A-132320	UUGGAGUCAACACUUUCGAUU	381	A-132321	AAUCGAAAGUGUUGACUCCAAGC	86_109	431
AD-66170	A-132432	AACACUUUCGAUUCACCUIUA	382	A-132433	UAAAGUGGAAUCGAAAGUGUUGA	94_117	432
AD-66166	A-132424	AGGAGCAUAAAGUACAAGCUIA	383	A-132425	UAGCUUUGUACUUUAGCUCUUG	126_149	433
AD-66173	A-132438	GAGCAUAAAGUACAAGCUGAA	384	A-132439	UUCAGCUUUGUACUUUAGCUCU	128_151	434
AD-66177	A-132446	UAAGUACAAGCUGAAGAGCA	385	A-132447	UGCUCUUCAGCUUUGUACUUUAG	133_156	435
AD-66161	A-132414	AAGUACAAGCUGAAGAGCAA	386	A-132415	UUGCUUCUUCAGCUUUGUACUUU	134_157	436
AD-66114	A-132318	UACCACAAAAGUACCCACAAA	387	A-132319	UUUGUGGGUACAUUUGUGGUACA	218_241	437
AD-66179	A-132450	CCACAAAAGUACCCACAAGGA	388	A-132451	UCCUUGUGGGUACAUUUGUGGUA	220_243	438
AD-66160	A-132412	UACUGUUGGAGCCCAAGAAA	389	A-132413	UUUCUUGGGUCCCAACAGAUUC	305_328	439
AD-66171	A-132434	ACUGUUGGAGCCCAAGAAA	390	A-132435	UUUCUUGGGUCCCAACAGAUU	306_329	440
AD-66189	A-132470	CUGUUUGGAGCCCAAGAAAGU	391	A-132471	ACUUUCUUGGGUCCCAACAGUA	307_330	441
AD-66122	A-132334	GGAGCCCAAGAAAGUAAAAGA	392	A-132335	UCUUUCACUUUCUUGGGUCCAA	313_336	442
AD-66176	A-132444	GAGCCCAAGAAAGUAAAAGAA	393	A-132445	UUCUUUCACUUUCUUGGGUCCAA	314_337	443
AD-66125	A-132340	AGCCCAAGAAAGUAAAAGACA	394	A-132341	UGUCUUUCACUUUCUUGGGUCC	315_338	444
AD-66112	A-132314	GCCCAAGAAAGUAAAAGACCA	395	A-132315	UGGUCUUUCACUUUCUUGGGUC	316_339	445
AD-66172	A-132436	CCCAAGAAAGUAAAAGACCAA	396	A-132437	UUGGUCUUUCACUUUCUUGGGU	317_340	446
AD-66127	A-132344	CAAGAAAGUAAAAGACCAUUA	397	A-132345	UAAUGGUCUUUCACUUUCUUGGG	319_342	447
AD-66162	A-132416	GAAAGUGAAAGACCACUGCAA	398	A-132417	UUGCAGUGGUCUUUCACUUUCU	322_345	448
AD-66181	A-132454	AAAGUGAAAGACCACUUCGAGA	399	A-132455	UCUGCAGUGGUCUUUCACUUUCU	323_346	449
AD-66184	A-132460	UCACUGGAAACCACUUCGCGAGA	400	A-132461	UCUGGCAGUGGUUCCAGUGAGG	420_443	450
AD-66182	A-132456	ACUGCCAGAAAGAGAAGUGCU	401	A-132457	AGCACUUCUUCUUGGCAGUGG	432_455	451
AD-66167	A-132426	CUGCCAGAAAGAGAAGUGCUU	402	A-132427	AAGCACUUCUUCUUGGCAGUG	433_456	452
AD-66165	A-132422	CAGAAAGAGAAGUGCUUUGAA	403	A-132423	UUCAAAGCACUUCUUCUUGGC	437_460	453
AD-66155	A-132402	AGAAAGAGAAGUGCUUUGAGA	404	A-132403	UCUCAAGCACUUCUUCUUGG	438_461	454
AD-66159	A-132410	AGUGCUUUGAGCCUCAGCUUA	405	A-132411	UAAGCUGAGGCUCAAAGCACUUC	447_470	455
AD-66168	A-132428	UUCCACAAGAAUGAGAUUAGA	406	A-132429	UCAUAUCUAUUUCUUGGAAAA	476_499	456
AD-66185	A-132462	UCCACAAGAAUGAGAUUAGGU	407	A-132463	ACCAUAUCUAUUUCUUGGAAA	477_500	457
AD-66156	A-132404	CCACAAGAAUGAGAUUAGGUA	408	A-132405	UACCAUAUCUAUUUCUUGGAA	478_501	458
AD-66113	A-132316	AAGAAUGAGAUUAGGUUAGA	409	A-132317	UCUAUACCAUAUCUAUUCUUGU	482_505	459
AD-66188	A-132468	UGGUUAGAACUGAGCAAGCA	410	A-132469	UGCUUGCUCAGUUCUAUACCAUA	494_517	460
AD-66190	A-132472	GUUAUGAACUGAGCAAGCAGA	411	A-132473	UCUGCUUGCUCAGUUCUAUACCA	496_519	461
AD-66180	A-132452	AUAGAACUGAGCAAGCAGCUA	412	A-132453	UAGCUGCUUGCUCAGUUCUAUAC	498_521	462
AD-66117	A-132324	CCAGAUGCCAGUGCAAGGGUA	413	A-132325	UACCCUUGCACUGGCACUUGGCC	522_545	463
AD-66169	A-132430	GCCAGUGCAAGGGUCCUGAUA	414	A-132431	UAUCAGGACCCUUGCACUGGCAU	528_551	464
AD-66174	A-132440	CAGUGCAAGGGUCCUGAUGCA	415	A-132441	UGCAUCAGGACCCUUGCACUGGC	530_553	465
AD-66175	A-132442	ACCAAGGCAAGCUGCUUUGAU	416	A-132443	AUCAUAGCAGCUUGCCUUGGUGU	683_706	466
AD-66158	A-132408	CCAAGGCAAGCUGCUUUGAUA	417	A-132409	UAUCAUAGCAGCUUGCCUUGGUG	684_707	467
AD-66119	A-132328	AGGCUUCAUGUCCACUCAUA	418	A-132329	UAUGAGUGGGACAUGAAGCCUAG	974_997	468
AD-66187	A-132466	GGCUCCGCAAGAGUCUGUCUU	419	A-132467	AAGACAGACUUCUGGGAGCCGC	1131_1154	469
AD-66163	A-132418	GCUCGCAAGAGUCUGUCUUA	420	A-132419	UAAGACAGACUUCUGGGAGCCG	1132_1155	470
AD-66116	A-132322	CCGCAAGAGUCUGUCUUCGAU	421	A-132323	AUCGAAGACAGACUUCUGGGAG	1135_1158	471
AD-66137	A-132364	GUUCGAGGGGCUGAAGAAUA	422	A-132365	UAUUCUUCAGCCCCUCGAACUG	1570_1593	472
AD-66183	A-132458	GGAAGGCAAGAUUGUGUCCCA	423	A-132459	UGGGACACAUCUUGCCUCCAU	1956_1979	473
AD-66164	A-132420	AGGCAAGAUUGUGUCCCAUUA	424	A-132421	UAAUGGGACACAUCUUGCCUUC	1959_1982	474
AD-66121	A-132332	AACUCAUAAAAGUGCUUUGAA	425	A-132333	UUCAAAGCACUUUUAUUGAUUUC	2017_2040	475
AD-66126	A-132342	AAUAAAAGUCUUUGAAAACGU	426	A-132343	ACGUUUUCAAGCACUUUUAUUGA	2022_2045	476
AD-66178	A-132448	AGUGCUUUGAAAAGCUGAGA	427	A-132449	UCUCAGCAUUUCAAAGCACUUU	2027_2050	477

Таблица 10. Модифицированные последовательности F12

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Название антисмыслового олигонуклеотида	Антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
AD-66186	A-132464	GfsgsUfgAfgCfuUFGfGfaGfucFafAfcAfcUfL96	478	A-132465	asGfeuGfuUfgAfcUfcccaAfgCfuCfaCfcasag	528
AD-66157	A-132406	GfsasGfcUfuGfgAfgUfcAfaCfaCfuUfuAfl96	479	A-132407	usAfsaAfgUfgUfuGfacuCfcAfaGfcUfcsasc	529
AD-66118	A-132326	CfsusUfgGfaGfucFAfAfcAfcUfuUfcGfaUfL96	480	A-132327	asUfscGfaAfaGfuGfuugAfcUfcCfaAfgscsu	530
AD-66115	A-132320	UfsusGfgAfgUfcAFAfAfcCfuUfcGfgAfuUfL96	481	A-132321	asAfsuCfGfaAfaAfgUfguuGfaCfuCfaAfasgsc	531
AD-66170	A-132432	AfsasCfaCfuUfuCfGfAfuUfcCfaCfcUfuAfl96	482	A-132433	usAfsaGfgUfgGfaAfcuGfaAfaAfgUfgUfusgsa	532
AD-66166	A-132424	AfsgsGfaGfcAfuAfaAfgUfcAfaAfcUfuAfl96	483	A-132425	usAfsGcUfuUfuGfaAfcuuAfuGfcUfcCfususc	533
AD-66173	A-132438	GfsasGfcAfuAfaGfUFAfAfcAfaAfgCfuGfaAfl96	484	A-132439	usUfscAfgCfuUfuGfuacUfuAfuGfcUfcsesu	534
AD-66177	A-132446	UfsasAfgUfaCfaAfaAfgUfgAfaGfaGfaAfl96	485	A-132447	usGfscUfcUfuCfaGfcuuUfgUfaCfuUfasusc	535
AD-66161	A-132414	AfsasGfuAfcAfaAfgUfcUfuGfaAfgCfaAfl96	486	A-132415	usUfsgCfuCfuUfcAfgcuUfuGfaAfcUfusasu	536
AD-66114	A-132318	UfsasCfcAfaAfaUfgUfcAfcCfaCfaAfaAfl96	487	A-132319	usUfsuGfuGfgGfaAfcuuUfuGfuGfgUfascsu	537
AD-66179	A-132450	GfscsAfcAfaAfaUfgUfcAfcCfaAfaAfl96	488	A-132451	usCfscUfuGfuGfgGfaAfcuuUfuGfuGfgscsu	538
AD-66160	A-132412	UfsasCfuGfuUfuGFGfAfgCfcCfaAfgAfaAfl96	489	A-132413	usUfsuCfuUfgGfgCfcuuAfaAfcAfgUfasusc	539
AD-66171	A-132434	AfscsUfgUfuUfgGfAfgCfcCfaAfaAfaAfl96	490	A-132435	usUfsuUfcUfuGfgGfcuCfaAfaCfaGfusasu	540
AD-66189	A-132470	CfsusGfuUfuGfgAfgCfcCfaAfaAfgUfL96	491	A-132471	asCfsuUfuCfuUfgGfgCfcCfaAfaAfgusasa	541
AD-66122	A-132334	GfsgsAfgCfcCfaAfgUfaAfgUfgAfaAfl96	492	A-132335	usCfsuUfuCfaCfuUfcuuUfgGfgCfcCfasasa	542
AD-66176	A-132444	GfsasGfcCfcAfaGfaAfaGfuGfaAfaAfl96	493	A-132445	usUfscUfuUfcAfcUfcuuUfuGfgGfcUfcsesa	543
AD-66125	A-132340	AfsgsCfcCfaAfgAfaAfgUfgAfaAfgAfl96	494	A-132341	usGfsuCfuUfuCfaCfuuuCfuUfgGfgCfusesc	544
AD-66112	A-132314	GfscsAfcAfaAfaUfgUfcAfcCfaAfaAfl96	495	A-132315	usGfsgUfcUfuUfgGfaAfcuuUfuGfuGfgscsu	545
AD-66172	A-132436	CfscsCfaAfgAfaAfgUfgAfaAfgCfaAfl96	496	A-132437	usUfsgGfuCfuUfuCfacuUfuCfuUfgGfgscsu	546
AD-66127	A-132344	CfsasAfgAfaAfgUfgGfaAfgAfcCfaUfuAfl96	497	A-132345	usAfsaUfgGfuCfuUfucacfuUfuCfuUfgsgsg	547
AD-66162	A-132416	GfsasAfaGfuGfaAfaGfaCfcAfuUfcGfaAfl96	498	A-132417	usUfsgCfaAfuGfgUfcuuUfcAfcUfuUfcsusu	548
AD-66181	A-132454	AfsasAfgUfgAfaAfgUfcCfaUfuGfgAfaAfl96	499	A-132455	usCfsuGfcAfaUfgGfcuuUfuCfaCfuUfuscsu	549
AD-66184	A-132460	UfscsAfcUfgGfaAfaAfcAfcUfcGfcAfaAfl96	500	A-132461	usCfsuGfgCfaGfuGfguuUfcCfaGfuGfasgsg	550
AD-66182	A-132456	AfscsUfgCfcAfgAfaAfgAfgAfaGfuGfcUfL96	501	A-132457	asGfscAfcUfuCfuUfcuuCfuGfgCfaGfusgsg	551
AD-66167	A-132426	CfsusGfcCfaGfaAfaAfgGfaAfaUfgUfcUfL96	502	A-132427	asAfsGcfaCfaUfuUfcuuUfcUfgGfcAfgusgsg	552
AD-66165	A-132422	CfsasGfaAfaGfaGfaAfgUfgCfuUfuAfl96	503	A-132423	usUfscAfaAfgCfaCfaUfcUfuUfcUfgscsg	553
AD-66155	A-132402	AfsgsAfaAfgAfaAfgUfcUfuUfgAfaAfl96	504	A-132403	usCfsuCfaAfaGfcAfcuuCfuCfuUfuUfusgsg	554
AD-66159	A-132410	AfsgsUfgCfuUfuGFAfGfcCfuCfaCfuUfuAfl96	505	A-132411	usAfsaGfcUfgAfgGfcuAfaAfgCfaCfususc	555
AD-66168	A-132428	UfsusCfcAfcAfaGfaAfaGfaGfaUfuAfl96	506	A-132429	usCfsaUfaUfcUfcAfcuuUfuGfuGfgAfasasa	556
AD-66185	A-132462	UfscsCfaCfaAfgAfaUfgAfgAfaUfuGfgUfL96	507	A-132463	asCfscAfaAfcUfcfauuCfuUfgUfgGfasasa	557
AD-66156	A-132404	CfscsAfcAfaGfaAfaUfgGfaGfaUfuGfgUfL96	508	A-132405	usAfsccfaUfaUfcUfcuuUfcUfuGfuGfgsasa	558
AD-66113	A-132316	AfsasGfaAfuGfaGfaUfuUfgGfaAfaAfl96	509	A-132317	usCfsuAfaAfcCfaUfaucUfcAfuUfuUfusgsg	559
AD-66188	A-132468	UfsgsGfuAfaAfgAfaCfcUfuGfaGfaCfaAfl96	510	A-132469	usGfscUfuGfcUfcAfgcuUfgCfuUfcCfasasa	560
AD-66190	A-132472	GfsusAfuAfgAfaCfuUfgGfaGfaCfaAfl96	511	A-132473	usCfsuGfcUfuGfcUfcagUfuCfuAfaAfcscsa	561
AD-66180	A-132452	AfsusAfgAfaCfuGFAfGfcAfaGfcAfgCfuAfl96	512	A-132453	usAfsGcUfuGfcUfcGfcuAfgUfuCfaAfusasc	562
AD-66117	A-132324	CfscsAfgAfuGfcCfaGfgUfcAfaGfgUfuAfl96	513	A-132325	usAfsccfcUfuGfcAfcugGfcAfuCfuGfgscsc	563
AD-66169	A-132430	GfscsCfaGfuGfcAfaAfgGfgGfcUfcGfaAfl96	514	A-132431	usAfsuCfaGfgAfcCfcuuGfcAfcUfgGfcfasu	564
AD-66174	A-132440	CfsasGfuGfcAfaGfgGfgGfcUfgAfaGfaAfl96	515	A-132441	usGfscAfuCfaGfgAfcocUfuGfcAfcUfgsgsc	565
AD-66175	A-132442	AfscsCfaAfgGfcAfaAfgGfcUfgCfuUfuAfl96	516	A-132443	asUfscAfaAfgCfaAfcuuGfcCfuUfgGfgusgsu	566
AD-66158	A-132408	CfscsAfaGfgCfaAfgGfcUfuUfgAfaAfl96	517	A-132409	usAfsuCfaUfaGfcAfcuuUfgCfuUfgGfgusgsg	567
AD-66119	A-132328	AfagsGfcUfuCfaUfgUfcCfcAfcUfcAfaAfl96	518	A-132329	usAfaGfaGfuGfgGfacaUfgAfaGfcCfusaag	568
AD-66187	A-132466	GfsgsCfuCfcGfcAfaAfgGfaGfuCfuGfcUfL96	519	A-132467	asAfsGcAfaAfgAfcUfcuuGfcGfgAfgCfcsgsc	569
AD-66163	A-132418	GfscsUfcCfcGfaAfgGfgUfcUfgUfuAfl96	520	A-132419	usAfsaGfaCfaGfaCfcuuUfgCfGfgGfcscsg	570
AD-66116	A-132322	CfscsGfcAfaGfaGfuUfcUfuGfcUfuAfl96	521	A-132323	asUfscGfaAfgAfcAfgacUfcUfuGfcGfgsasg	571
AD-66137	A-132364	GfsusUfcGfaGfgGfgGfcUfgAfaGfaAfl96	522	A-132365	usAfsuUfcUfuCfaGfcccCfcUfcGfaAfcusug	572
AD-66183	A-132458	GfsgsAfaGfgCfaAfgGfaUfgUfgUfcCfaAfl96	523	A-132459	usGfsgGfaCfaCfaAfcuuUfgCfcUfcCfasasa	573
AD-66164	A-132420	AfsgsGfcAfaGfaUfuUfgGfuCfcCfaUfuAfl96	524	A-132421	usAfsaUfgGfgAfaAfcuuUfcUfuGfcCfususc	574
AD-66121	A-132332	AfsasCfuCfaAfaAfaAfgUfgCfuUfuGfaAfl96	525	A-132333	usUfscAfaAfgCfaCfuuuAfuUfgAfgUfususc	575
AD-66126	A-132342	AfsasUfaAfaGfuGfcUfuUfgAfaAfcUfgUfL96	526	A-132343	asCfsgUfuUfuCfaAfgacAfcUfuUfaUfusgsa	576
AD-66178	A-132448	AfsgsUfgCfuUfuGFAfAfaAfuGfcUfgAfaAfl96	527	A-132449	usCfsuCfaGfcAfuUfcuuAfaAfgCfaCfususu	577

Пример 4. Скрининг дуплексов siRNA для F12 in vitro.

Культура клеток и трансфекции.

Нер3b или клетки, представляющие собой первичные гепатоциты мыши (PMH) (MSCP10, № партии MS613), трансфицировали путем добавления 4,9 мкл Opti-MEM с 0,1 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по каталогу 13778-150) d 5 мкл дуплексов siRNA в каждой лунке в 384-луночной планшете и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем сорок мкл DMEM (Нер3b) в среде Е по Уильямсу (PMH), содержащей приблизительно 5×10<sup>3</sup> клеток, добавляли в смесь siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед очисткой РНК.

Эксперименты с однократной дозой выполняли при конечной концентрации дуплекса 10 и 0,01 нМ и эксперименты в отношении дозозависимого эффекта проводили в пределах диапазона конечной концентрации дуплекса от 10 нМ до 36 фМ с использованием 8-, 6-кратных разведений.

Выделение общей РНК с применением набора "DYNABEADS mRNA Isolation Kit".

РНК выделяли при помощи автоматизированного протокола на платформе BioTek-EL406 с применением парамагнитных микрочастиц DYNABEADS (Invitrogen, № по каталогу 61012). Вкратце, 50 мкл смеси лизирующего/связывающего буфера и 25 мкл лизирующего буфера, содержащего 3 мкл магнитных гранул, вносили в планшет с клетками. Планшеты инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем магнитные гранулы фиксировали и удаляли супернатант. Связанную с гранулами РНК затем промывали 2 раза 150 мкл промывочного буфера А и однократно промывочным буфером В. Гранулы затем промывали 150 мкл элюирующего буфера, повторно фиксировали и удаляли супернатант.

Синтез кДНК с использованием набора для обратной транскрипции ABI High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Форстер-Сити, Калифорния, № по кат. 4368813)

Десять мкл мастер-микса, содержащего 1 мкл 10× буфера, 0,4 мкл 25× dNTP, 1 мкл 10× случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 6,6 мкл H<sub>2</sub>O на реакцию, добавляли в РНК, выделенную как описано выше. Планшеты запечатывали, перемешивали и инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего в течение 2 ч при 37°C. Планшеты затем инкубировали при 81°C в течение 8 мин.

ПЦР в режиме реального времени.

Два мкл кДНК добавляли в мастер-микс, содержащий 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH (Hs99999905\_ml или 4352339E), 0,5 мкл зонда для F12 (Hs00166821 или Mm00491349) и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № по каталогу 04887301001) на лунку в 384-луночные планшеты (Roche, № по каталогу 04887301001). ПЦР в режиме реального времени выполняли с применением системы LightCycler480 для ПЦР в режиме реального времени (Roche) с применением  $\Delta\Delta C_t$  (RQ)-анализа. Каждый дуплекс исследовали в четырех независимых трансфекциях.

Для расчета относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с использованием способа  $\Delta\Delta C_t$  и нормализовали относительно анализов, выполненных с клетками, трансфицированными с помощью 10 нМ AD-1955, или ложно-трансфицированными клетками. Значения IC<sub>50</sub> рассчитывали с применением модели согласования по 4 параметрам с использованием XLFit и нормализовали относительно данных для клеток, трансфицированных AD-1955, контролем, не осуществляющим целенаправленное воздействие, или интактных клеток.

Смысловая и антисмысловая последовательности AD-1955 представляют собой:

Смысловая: cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT (SEQ ID NO: 2343);

Антисмысловая: UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT (SEQ ID NO: 2344).

В табл. 11 приведены результаты скрининга в отношении однократной дозы в клетках Hep3b, трансфицированных указанными iRNA для F12 человека. В табл. 12 приведены результаты скрининга в отношении ответа на однократную дозу в клетках Hep3b, трансфицированных указанными iRNA для F12 человека. В табл. 13 приведены результаты скрининга в отношении однократной дозы в первичных гепатоцитах мыши, трансфицированных указанными iRNA для F12 мыши. В табл. 14 приведены результаты скрининга в отношении дозозависимого эффекта в первичных гепатоцитах мыши, трансфицированных указанными iRNA для F12 человека. Данные выражены в виде процента остаточной мРНК в сравнении с AD-1955.

Таблица 11. Скрининг в отношении однократной дозы для F12 в клетках Нер3b

ID дуплекса	10 нМ, средн.	0,1 нМ, средн.	10 нМ, станд. отклон.	0,1 нМ, станд. отклон.
AD-66186	33,1	88,4	5,3	12,6
AD-66157	62,2	85,3	9,6	13,2
AD-66118	47,4	59,4	2,9	10,6
AD-66115	54,8	73,9	4,8	3
AD-66170	31,6	57,3	3,9	12,5
AD-66166	74,7	88,8	14,3	15,8
AD-66173	22,3	58,5	7,6	11,8
AD-66177	52,9	86,7	6,9	6,3
AD-66161	50,3	59,9	7,9	10
AD-66114	42,1	82,3	5,3	8,5
AD-66179	78,4	101,4	14,3	16,1
AD-66160	45,4	82,3	13,4	18,5
AD-66171	74,8	126,2	12,1	28,2
AD-66189	49,3	78,1	16,6	9,1
AD-66122	47,2	94,9	7,4	7,5
AD-66176	42,7	69,4	5,2	7
AD-66125	46	91,8	7,5	17,4
AD-66112	60,4	136,8	11,4	14,4
AD-66172	34,9	70,2	13,1	11,1
AD-66127	39,5	73,3	8,5	12,4
AD-66162	79,1	93,6	13	24,7
AD-66181	59,8	101,7	1,2	5,4
AD-66184	34	72,9	7,8	14,9
AD-66182	47	101	8,8	7,9
AD-66167	30,3	60,2	2,6	5,9
AD-66165	44,3	63,2	11,4	22,3
AD-66155	45,3	72,8	13,5	16,1
AD-66159	49,6	98	8,4	31,2
AD-66168	25,5	52,9	5,8	16,6
AD-66185	40,8	81,7	3,8	11,5

## 045013

AD-66156	30,8	75,6	4,4	5,4
AD-66113	42,1	76	8,1	5,9
AD-66188	43,9	82,1	9,1	15,4
AD-66190	40,2	74,9	9	8,3
AD-66180	34,6	83,1	6,6	23,3
AD-66117	48,9	108,1	4,1	9,5
AD-66169	64,9	89,4	9,8	1,9
AD-66174	55,4	107,6	7,9	23
AD-66175	37,9	104,7	4	19,7
AD-66158	55	107,3	14,7	31,7
AD-66119	27,6	69,8	3,4	4,3
AD-66187	53,3	105	19,6	9,6
AD-66163	33,6	53,9	5,1	4,9
AD-66116	33,9	57,4	10,4	12,6
AD-66137	103,4	136,7	6,6	15,9
AD-66183	36,5	91,9	8	12,7
AD-66164	31,3	78,2	5,1	6,4
AD-66121	26,5	72,1	2,7	18,3
AD-66126	33,2	56,7	2,6	12,6
AD-66178	51,1	72,1	6,3	16,5

Таблица 12. Скрининг в отношении дозозависимого эффекта для F12 в клетках Нер3b

ID дуплекса	IC <sub>50</sub> (нМ)
AD-66170	0,085
AD-66173	0,244
AD-66176	нет данных
AD-66125	нет данных
AD-66172	0,398
AD-66167	0,457
AD-66165	0,058
AD-66168	0,657
AD-66163	0,481
AD-66116	0,089
AD-66126	0,086

Таблица 13. Скрининг в отношении однократной дозы для F12 в первичных гепатоцитах мыши

ID дуплекса	10 нМ, средн.	0,1 нМ, средн.	10 нМ, станд. отклон.	0,1 нМ, станд. отклон.
AD-66186	93,1	102,6	2	6,6
AD-66157	97,4	114,5	16,5	17
AD-66118	65,9	93	11,6	11,9
AD-66115	61,8	89	5,5	8,9
AD-66170	88	98,5	11,7	8,4
AD-66166	106,8	98,5	8,8	5,2
AD-66173	106,8	106	11,2	14,8
AD-66177	87,5	103	3,6	3,2
AD-66161	94,4	103,1	7	15,9
AD-66114	38,6	79,1	4,1	5
AD-66179	71,1	105,7	6,8	18,2
AD-66160	14,6	106,8	1,2	8,7
AD-66171	17,7	102,5	2,3	6,1
AD-66189	9,1	90,2	1,3	6,1
AD-66122	14,4	95,7	0,7	13,9
AD-66176	10,9	85,8	2,1	4,6
AD-66125	12,6	80,5	2,1	6,2
AD-66112	19,1	82	7,2	3,5
AD-66172	4,2	75,3	0,4	6,7
AD-66127	7,4	48,4	3,7	7,3
AD-66162	3,9	30,6	1,9	4,9
AD-66181	7,2	69,2	0,9	4,1
AD-66184	93,6	110,9	4,1	6,8
AD-66182	13,4	89,9	1,3	2
AD-66167	4,8	55,5	0,5	2,6
AD-66165	2,1	18,7	0,3	3,6
AD-66155	5,7	48	0,7	5,1
AD-66159	7,2	88,7	0,5	3,7
AD-66168	65,6	105,6	1,6	11,3
AD-66185	96	108,9	3,1	16

AD-66156	56,8	107,2	3,5	8,8
AD-66113	72,8	88,7	4,8	5,5
AD-66188	117,5	95,5	17,3	4,9
AD-66190	118,3	96,5	5,8	8,4
AD-66180	121,4	109,3	15,2	6,6
AD-66117	72,3	89,1	7,4	8,5
AD-66169	89,4	103,7	8,8	4,2
AD-66174	92	103,4	18,1	8,4
AD-66175	89,5	112,9	13,7	8,9
AD-66158	103,9	105,3	11,5	15,2
AD-66119	66,5	92	8,9	9
AD-66187	109,1	107	16,4	10,3
AD-66163	89,9	106	6,8	6,1
AD-66116	69,8	97	8,2	10,6
AD-66137	17,6	94,1	2,1	8,7
AD-66183	100,1	109,6	7,6	8,4
AD-66164	84	98,8	10,2	9,8
AD-66121	2,5	30,5	0,4	3,2
AD-66126	4,1	22,3	0,3	2,3
AD-66178	79,6	112,8	6,8	16,5

Таблица 14. Скрининг в отношении дозозависимого эффекта для F12 в первичных гепатоцитах мыши

ID дуплекса	IC <sub>50</sub> (нМ)
AD-66170	нет данных
AD-66173	нет данных
AD-66176	3,571
AD-66125	14,962
AD-66172	1,104
AD-66167	1,013
AD-66165	0,231
AD-66168	нет данных
AD-66163	нет данных
AD-66116	нет данных
AD-66121	0,119
AD-66126	0,045

Пример 5. Синтез siRNA для KNG1.

Источники получения реагентов.

Если источник получения реагента конкретно не приведен в данном документе, такой реагент можно приобрести у любого поставщика реагентов для использования в молекулярной биологии со стандартными качеством/чистотой для применения в молекулярной биологии.

Транскрипты.

Конструирование siRNA.

Набор siRNA, целенаправленно воздействующих на KNG1 человека, "кининоген 1" (человек: ID эталонной последовательности в NCBI NM\_001166451; ID гена в NCBI: 3827), а также на ортологи KNG1 в исследованиях видовой токсичности (яванский макак: XM\_005545463; мыши: NM\_001102409; крыса, NM\_012 696) были сконструированы с помощью специально разработанных скриптов на языке R и Python. Эталонная последовательность NM\_001166451 мРНК человека имеет длину 2035 оснований. Логическое обоснование и способ применения набора конструкций siRNA заключались в следующем: прогнозируемую эффективность для каждой потенциальной 19-мерной siRNA от положения 235 до положения 2035 включительно (кодирующий участок и 3'-UTR) определяли с помощью линейной модели, с помощью которой прогнозировали непосредственный показатель нокдауна мРНК, исходя из данных по более чем 20000 различных конструкций siRNA, целенаправленно воздействующих на большое количество генов позвоночных. Поднаборы siRNA для KNG1 конструировали с идеальными или почти

идеальными совпадениями между человеком и яванским макаком. Дополнительный поднабор конструировали с идеальными или почти идеальными совпадениями с ортологами KNG1 мыши или крысы. Для каждой нити siRNA в полном переборе использовали сделанный по индивидуальному заказу скрипт на языке Python для измерения количества и определения положений ошибок спаривания между siRNA и всеми потенциальными выравниваниями в транскриптоме целевого вида. Дополнительные баллы присваивали за ошибки спаривания в затравочном участке, определенном в данном случае как положения 2-9 антисмыслового олигонуклеотида, равно как и в сайте расщепления siRNA, определенном в данном случае как положения 10-11 антисмыслового олигонуклеотида.

Относительные баллы за ошибки спаривания составляли 2,8 для ошибок спаривания в затравочном участке, 1,2 для ошибок спаривания в сайте расщепления и 1 для ошибок спаривания в других положениях вплоть до положения 19 антисмыслового олигонуклеотида. Ошибки спаривания в первом положении игнорировали. Балл за специфичность рассчитывали для каждой нити путем суммирования значений каждой взвешенной ошибки спаривания. Предпочтение отдавали тем siRNA, "антисмысловой" балл которых для человека и макака-крабеода составлял  $\geq 3,0$ , и прогнозируемая эффективность представляла собой  $\geq 70\%$  нокдаун транскрипта NM\_001166451.

Подробный перечень немодифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей KNG1 показан в табл. 15. Подробный перечень модифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей KNG1 показан в табл. 16.

#### Синтез siRNA.

Последовательности siRNA для KNG1 синтезировали в масштабе 1 мкмоль на синтезаторе Mermade 192 (BioAutomation) с применением фосфорамидитной химии при посредстве твердой подложки. Твердая подложка представляла собой стеклянную подложку с заданным размером пор (500 Å), нагруженную созданным по индивидуальному заказу лигандом GalNAc, или универсальную твердую подложку (AM biochemical). Вспомогательные реагенты для синтеза, 2'-F- и 2'-O-метил-PHK и дезоксо-фосфорамидиты, получали от Thermo-Fisher (Милуоки, Висконсин) и HONGENE (Китай). 2'F, 2'-O-метил, GNA (гликоль-нуклеиновые кислоты), 5'-фосфат и другие модификации вводили с использованием соответствующих фосфорамидитов. Синтез отдельных нитей, конъюгированных с GalNAc по 3'-концу, выполняли на модифицированной GalNAc CPG-подложке. Сделанную по индивидуальному заказу универсальную твердую CPG-подложку использовали для синтеза отдельных антисмысловых нитей. Время связывания для всех фосфорамидитов (100 мМ в ацетонитриле) составляло 5 мин при использовании 5-этилтио-1Н-тетразола (ЕТТ) в качестве активатора (0,6М в ацетонитриле). Фосфоротиоатные связи получали с использованием 50 мМ раствора 3-((диметиламино-метилиден)амино)-3Н-1,2,4-дигидро-3-тиона (DDTT, получали от Chemgenes (Уилмингтон, Массачусетс, США) ) в безводном ацетонитриле/пиридине (1:1 объем/объем). Время окисления составляло 3 мин. Все последовательности синтезировали с удалением в конечном итоге группы DMT ("без DMT").

По завершении твердофазного синтеза олигорибонуклеотиды отщепляли от твердой подложки и с них снимали защитную группу в запечатанных планшетах с 96 глубокими лунками с использованием 200 мкл реагента в виде водного метиламина при 60°C в течение 20 мин. Для последовательностей, содержащих 2'-рибозные остатки (2'-ОН), которые были защищены группой трет-бутилдиметилсилила (TBDMS), вторую стадию снятия защиты выполняли с применением реагента TEA·3HF (триэтиламина тригидрофторида). Для удаления защитных групп в раствор метиламина добавляли 200 мкл диметилсульфоксида (DMSO) и 300 мкл реагента TEA·3HF, и раствор инкубировали в течение дополнительных 20 мин при 60°C. В конце стадии отщепления и удаления защитных групп планшету для синтеза давали достичь комнатной температуры, и в нем проводили осаждение путем добавления 1 мл смеси ацетонитрил:этанол (9:1). Планшеты охлаждали при -80°C в течение 2 ч и супернатант аккуратно удаляли при помощи многоканальной пипетки. Осадок с олигонуклеотидами ресуспендировали в 20 мМ буфера NaOAc и обессоливали с использованием 5 мл колонки для эксклюзионной хроматографии HiTrap (GE Healthcare) на "AKTA Purifier System", оснащенной устройством автоматической подачи образцов A905 и коллектором фракций Frac 950. Обессоленные образцы собирали в 96-луночные планшеты. Образцы из каждой последовательности анализировали при помощи LC-MS для подтверждения идентичности, УФ (260 нм) для количественного определения, а выбранный набор образцов анализировали при помощи IEX-хроматографии для определения чистоты.

Отжиг отдельных нитей KNG1 осуществляли на автоматическом устройстве Тесап для манипуляции с жидкостями. Эквивалентную смесь смысловых и антисмысловых отдельных нитей объединяли и гибридизовали в 96-луночных планшетах. После объединения отдельных комплементарных нитей 96-луночный планшет плотно запечатывали и нагревали в печи при 100°C в течение 10 мин, и позволяли ему медленно достичь комнатной температуры за период 2-3 ч. Концентрацию каждого дуплекса нормализовали к 10 мкМ в 1× PBS и затем подвергали скрининговым анализам *in vitro*.

Таблица 15. Немодифицированные последовательности KNG1

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Название антисмыслового олигонуклеотида	Антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Положение в NM_001166451
AD-66259	A-132506	GAGGAAAUUGACUGCAAUGAA	578	A-132507	UUCAUUGCAGUCAUUUCCCGG	647	301_324
AD-66261	A-132510	CACGUUUUUAUCCUUAAGUA	579	A-132511	UACUUGAAGGAAUAAAACGUGUC	648	438_461
AD-66262	A-132512	UACCUACUCAUUGUGCAAAA	580	A-132513	UUUUGCACAAUUGAGUAGGUAU	649	822_845
AD-66263	A-132514	CUUUCUUAUUCAAGAUUGACA	581	A-132515	UGUCAUCUUGAAUAGAAAGUU	650	1118_1141
AD-66260	A-132508	AACCAUGUCCAAAGGAAAA	582	A-132509	UUUCCUUGGAAACAUUGGUUUC	651	1206_1229
AD-66341	A-132670	AAUAAAAGAAACAACUGU	583	A-132671	ACAGUUGUUUCUUUUUUAUUC	652	1416_1439
AD-66345	A-132678	AGAAGAAACAACUGUAAGUCA	584	A-132679	UGACUACAGUUGUUUCUUUU	653	1422_1445
AD-66328	A-132644	CGGGAUUCAGGAAAAGAACA	585	A-132645	UUGUUUUUCCUGAAUCCCGCU	654	1480_1503
AD-66317	A-132622	GGGAUUCAGGAAAAGACAAA	586	A-132623	UUUGUUUUUCCUGAAUCCCGC	655	1481_1504
AD-66333	A-132654	GGAUUCAGGAAAAGACAAA	587	A-132655	UCUUGUUUUUCCUGAAUCCCG	656	1482_1505
AD-66338	A-132664	GAUUCAGGAAAAGACAAAGGA	588	A-132665	UCCUUGUUUUUCCUGAAUCC	657	1483_1506
AD-66343	A-132674	AUUCAGGAAAAGACAAAGGA	589	A-132675	UCCUUGUUUUUCCUGAAUCC	658	1484_1507
AD-66319	A-132626	AAACAUGAACGUGACCAAGGA	590	A-132627	UCCUUGGUCACGUUCAUGUUUAU	659	1567_1590
AD-66346	A-132680	CACGAACAACAGCAUGGUCU	591	A-132681	AAGACCAUGCUGUUUGUCGUGUC	660	1624_1647
AD-66329	A-132646	GGUUCUUGGUCUUGGACUAAA	592	A-132647	UUUAUGUCCAUAGCAAGACCAU	661	1639_1662
AD-66270	A-132528	CUUGGUCUUGGACUUAAGUUA	593	A-132529	UAACUUUUGUCCAUAGCAAGAC	662	1642_1665
AD-66279	A-132546	UUGGUCAUGGACUUAAGUUCA	594	A-132547	UGAACUUUUGUCCAUAGCAAGGA	663	1643_1666
AD-66273	A-132534	GGUCAUGGACUUAAGUUCAAA	595	A-132535	UUUGAACUUUUGUCCAUAGCAAG	664	1645_1668
AD-66264	A-132516	AUGGACUUAAGUCAAACUUA	596	A-132517	UAAGUUUGAACUUUUGUCCAUAG	665	1649_1672
AD-66342	A-132672	GGACUUAAGUCAAACUUGAU	597	A-132673	AUCAAGUUUGAACUUUUGUCCAU	666	1651_1674
AD-66278	A-132544	CAUAAGUCAAACUUGAUGAU	598	A-132545	AUCAUCAAGUUUGAACUUUUGUC	667	1654_1677
AD-66277	A-132542	AUAAGUCAAACUUGAUGAU	599	A-132543	UAUCAUCAAGUUUGAACUUUUGUC	668	1655_1678
AD-66267	A-132522	UUCAAACUUGAUGAUGAUCU	600	A-132523	AAGAUCUUCUUCUUCUUCUUCU	669	1660_1683
AD-66325	A-132638	UCAACUUGAUGAUGAUCUUA	601	A-132639	UAAGAUCUUCUUCUUCUUCUUC	670	1661_1684
AD-66320	A-132628	AACUUGAUGAUGAUCUUGAAA	602	A-132629	UUUCAAGAUCUUCUUCUUCUUC	671	1664_1687
AD-66336	A-132660	GUCCUUGACCAUGGACUAAA	603	A-132661	UUUAUGUCCAUUGGUAAGGACAU	672	1699_1722
AD-66280	A-132548	GACCAUGGACUUAAGCAUAAA	604	A-132549	UUUAUGCUUUAUGUCCAUUGGCAA	673	1705_1728
AD-66272	A-132532	AUGGACUUAAGCAUUAAGCAUA	605	A-132533	UAUGCUUUAUGUCCAUUGGCAU	674	1709_1732
AD-66275	A-132538	GAAUGGAAAGCACAAGGUUA	606	A-132539	UAACCAUUGUCCAUUCCAUUCU	675	1767_1790
AD-66348	A-132684	GAAAGCACAAGGUUGGAAAA	607	A-132685	UUUCCAAACCAUUGGCUUCCCA	676	1772_1795
AD-66340	A-132668	AAGCACAAGGUUGGAAAAACA	608	A-132669	UGUUUCCAAACCAUUGGCUUUC	677	1774_1797
AD-66330	A-132648	AUGGUUGGAAAACAGAGCAU	609	A-132649	AAUGCUCGUUUUCCAAACCAUUG	678	1781_1804
AD-66306	A-132600	GGUUGGAAAACAGAGCAUUUA	610	A-132601	UAAAUGCUCGUUUUCCAAACCAU	679	1783_1806
AD-66322	A-132632	AUUUGGCAAGCUCUUCUGAAA	611	A-132633	UUUCAGAAAGCUCUUCGAAAAGC	680	1799_1822
AD-66274	A-132536	UCUUCUGAAGCAGUACUACA	612	A-132537	UGUAGUACUGUCUUCAGAAAGC	681	1810_1833
AD-66271	A-132530	CAGAGUGAUGACGAUUGGAUA	613	A-132531	UAUCCAAUCGUAUCACUCUGUA	682	1975_1998
AD-66339	A-132666	CUUUCAUUUAACCCAUAUCA	614	A-132667	UGAUUUUGGGUUAUUAAGAAAGC	683	2023_2046
AD-66276	A-132540	UUUCAUUUAACCCAUAUCA	615	A-132541	UUGAUUUUGGGUUAUUAAGAAAG	684	2024_2047
AD-66281	A-132550	UUUAACCCAUAUCAGAUUUU	616	A-132551	AAAUCUGAUUUUGGGUUAUUAAG	685	2029_2052
AD-66313	A-132614	UUUAACCCAUAUCAGAUUUU	617	A-132615	UAAAAUCUGAUUUUGGGUUAUUA	686	2030_2053
AD-66307	A-132602	GUGGCUAUGGGUUAUUUUUA	618	A-132603	UAAAGAAUACCCAUAUGCCACU	687	2172_2195
AD-66309	A-132606	UUUUUCAUACUUUUUUAAA	619	A-132607	UUUAAUAAAGUAUGAAAGAAU	688	2185_2208
AD-66316	A-132620	UUUUUCAUACUUUUUUAAA	620	A-132621	UUUUAAUAAAGUAUGAAAGAAU	689	2186_2209
AD-66321	A-132630	UCUUUCAUACUUUUUUAAA	621	A-132631	ACUUUAAUAAAGUAUGAAAGAAA	690	2187_2210
AD-66323	A-132634	UUCAUACUUUUUUAAAGUAUA	622	A-132635	UAUACUUUUAAUAAAGUAUGAAAG	691	2190_2213
AD-66315	A-132618	CUUUUAUAAAGUAUCAAUUA	623	A-132619	UAUAUUGAUACUUUUAAAGUA	692	2196_2219
AD-66268	A-132524	UUUAUUAAAGUAUCAAUUA	624	A-132525	UGAUUUUGAUACUUUUAAAGUA	693	2197_2220
AD-66332	A-132652	AAGUAUCAAUUCCUCUCUA	625	A-132653	UAGAGAGGGAUUUUGAUACUUUA	694	2204_2227

AD-66303	A-132594	CAUUGUCCAGAUGAAAAUUA	626	A-132595	UAUUAUUUCAUCUGGACAAUGGA	695	2225_2248
AD-66334	A-132656	AUGAAAAUUCUGAUUAUAU	627	A-132657	AUUUAUUCAGGAUUAUUUCAUCU	696	2235_2258
AD-66331	A-132650	UCUCCACGGACUGCAUAAAA	628	A-132651	AUUUUUUGCAGUCCGUGGAGACU	697	2327_2350
AD-66326	A-132640	CACGGACUGCAUAAAAUUGUA	629	A-132641	UACAAUUUUUUGCAGUCCGUGGA	698	2331_2354
AD-66312	A-132612	CUGCAAUUGGCUUCUCUGAUA	630	A-132613	UAUCAGAGAAGCCAAUUGCAGCA	699	2441_2464
AD-66304	A-132596	UGAUAACAAAUUGUACCUUA	631	A-132597	UAAGGUACAUUUUGUUUACAGA	700	2457_2480
AD-66324	A-132636	UACCUUACAACAUUUGUCAUA	632	A-132637	UAUGACAUUUGUUAAGGUACA	701	2471_2494
AD-66266	A-132520	UACAACAUAUGUCAUGAAUUU	633	A-132521	AAAUUCAUGACAUUUGUUGAAG	702	2476_2499
AD-66311	A-132610	AUUUUUGUCAUUUUUAUAAAA	634	A-132611	UUUAUUUAGAAUGACAAGAAUCU	703	2507_2530
AD-66335	A-132658	UUUUUGUCAUUUUUAUAAAA	635	A-132659	UUUUUUUAGAAUGACAAGAAUC	704	2508_2531
AD-66344	A-132676	UCUUGUCAUUUUUAUAAAA	636	A-132677	AGUUUUUUAAGAAUGACAAGAAU	705	2509_2532
AD-66305	A-132598	AUUUGAAUUGUGUGAAAAUA	637	A-132599	UAUUUUACACACAUUCAAUAC	706	2542_2565
AD-66318	A-132624	GAAUGUGUGAAAAUAAAGGA	638	A-132625	UCCUUUUUUACACACAUUCAA	707	2546_2569
AD-66308	A-132604	AUGUGUGUAAAAUAAAGGGA	639	A-132605	UUCUUUUUUUUACACACAUU	708	2548_2571
AD-66327	A-132642	GUGUGUAAAAUAAAGGGAAGU	640	A-132643	ACUUCUUUUUUUUACACACAU	709	2550_2573
AD-66337	A-132662	GUGUAAAAUAAAGGGAAGUCA	641	A-132663	UGACUUCUUUUUUUUACACAC	710	2552_2575
AD-66347	A-132682	UGUAAAAUAAAGGGAAGUCA	642	A-132683	UUGACUUCUUUUUUUUACACAC	711	2553_2576
AD-66269	A-132526	GUGAAAAUAAAGGGAAGUCA	643	A-132527	UUUGACUUCUUUUUUUUACAC	712	2554_2577
AD-66314	A-132616	AAUAAAGGGAAGUCAAGAGAU	644	A-132617	AAUCUCUUGACUUCUUUUUUUU	713	2559_2582
AD-66265	A-132518	GGGAAGUCAAGAGAUAAAAUA	645	A-132519	UAUUUUAAUCUCUUGACUUCUU	714	2564_2587
AD-66310	A-132608	UAAAUGCUGAACUUUAUUAUA	646	A-132609	UAUUAAUAAAGUUCAGCAUUUAU	715	2579_2602

Таблица 16. Модифицированные последовательности KNG1

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Название антисмыслового олигонуклеотида	Антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
AD-66259	A-132506	GfsasGfgAfaAfuUfgFafcUfgCfaAfuGfaAflL96	716	A-132507	usUfscAfuUfgCfaGfucaAfuUfcUfcUfcsgsg	785
AD-66261	A-132510	CfsasCfgrfuUfuAfuUfucCfuUfcaAfgAfaAflL96	717	A-132511	usAfsuCfuGfaAfgGfaauAfaAfaCfgrfugsusc	786
AD-66262	A-132512	UfsasCfcUfaCfuCfaAfaUfgUfgCfaAfaAflL96	718	A-132513	usUfsuUfgCfaCfaAfaUfgUfgUfasasu	787
AD-66263	A-132514	CfsusUfuCfuAfuUfUfCfaAfgAfuUfgAfaAflL96	719	A-132515	usGfsuCfaAfuCfuUfgaaAfaAfgAfaAfsusu	788
AD-66260	A-132508	AfsasCfcAfaAfuGfuUfUfCfaAfgGfaAfaAflL96	720	A-132509	usUfsuUfCfuUfgGfaacAfuGfuGfgUfususc	789
AD-66341	A-132670	AfsasUfaAfaAfgAfaAfgAfaCfaAfaUfgUfL96	721	A-132671	asCfsaGfuUfgUfUfcuUcUfuUfaUfususc	790
AD-66345	A-132678	AfsgsAfaGfaAfaCfaAfaUfgUfaAfgUfL96	722	A-132679	usGfsaCfuUfaCfaGfuUfgUfUfcUfcUfususu	791
AD-66328	A-132644	CfsgsGfgAfuUfcaAfgGfaAfaAfgAfaAflL96	723	A-132645	usUfsgUfuCfuUfuUfUfcuGfaAfuCfcUfcsgscu	792
AD-66317	A-132622	GfsgsGfaUfcaAfgGfaAfaAfgAfaAflL96	724	A-132623	usUfsuGfuUfcaUfUfuccUfgAfaUfcafcsgsc	793
AD-66333	A-132654	GfsgsAfuUfcaAfgGfaAfaAfgAfaAflL96	725	A-132655	usCfsuUfgUfcaUfUfuccUfgAfaUfcafcscsg	794
AD-66338	A-132664	GfsasUfuCfaGfgAfaAfaAfaAfaAflL96	726	A-132665	usCfscUfuGfuUfcaUfUfuccUfgAfaUfcafcsc	795
AD-66343	A-132674	AfsusUfcaAfgGfaAfaAfaAfaAfaAflL96	727	A-132675	usCfscCfuUfgUfcaUfUfuccUfgAfaUfcafcsc	796
AD-66319	A-132626	AfsasAfaAfaAfaAfaAfaAfaAfaAflL96	728	A-132627	usCfscUfuGfuUfcaUfUfuccUfgAfaUfcafcsc	797
AD-66346	A-132680	CfsasCfgrfuUfuAfuUfucCfuUfcaAfgAfaAflL96	729	A-132681	asAfsuAfaAfaAfaAfaAfaAfaAfaAflL96	798
AD-66329	A-132646	GfsgsUfcaUfcaAfgGfaAfaAfaAfaAflL96	730	A-132647	usUfsuAfuGfuCfaAfgAfaAfaAfaAflL96	799
AD-66270	A-132528	CfsusUfgGfuCfaUfGfgGfaCfaUfaAfgUfaAflL96	731	A-132529	usAfsaCfuUfaUfgUfccaUfgAfaUfcafcsgsc	800
AD-66279	A-132546	UfsusGfgUfcaAfgGfaAfaAfaAfaAflL96	732	A-132547	usGfsaAfaUfaAfuUfuccUfgAfaUfcafcsgsa	801
AD-66273	A-132534	GfsgsUfcaAfgGfaAfaAfaAfaAfaAflL96	733	A-132535	usUfsuGfaAfaUfaAfuUfuccUfgAfaUfcafcscasa	802
AD-66264	A-132516	AfsusGfgAfaAfaAfaAfaAfaAfaAflL96	734	A-132517	usAfsaGfuUfcaAfgGfaAfaAfaAfaAflL96	803
AD-66342	A-132672	GfsgsAfaAfaAfaAfaAfaAfaAfaAflL96	735	A-132673	asUfscAfaGfuUfcaAfgGfaAfaAfaAflL96	804
AD-66278	A-132544	CfsasUfaAfgUfcaAfaAfaAfaAfaAflL96	736	A-132545	asUfscAfaAfaAfgUfcaAfaAfaAfaAflL96	805
AD-66277	A-132542	AfsusAfaGfuUfcaAfaAfaAfaAfaAflL96	737	A-132543	usAfsuAfaAfaAfaAfaAfaAfaAfaAflL96	806
AD-66267	A-132522	UfsusCfaAfaCfuUfgGfaAfaAfaAfaAflL96	738	A-132523	asAfsuAfaAfaAfaAfaAfaAfaAfaAflL96	807

AD-66325	A-132638	UfscsAfaAfcUfuGfAfUfgAfuGfaUfcUfuAfL96	739	A-132639	usAfsaGfaUfcAfuCfaucAfaGfuUfuGfasasc	808
AD-66320	A-132628	AfsasCfuUfgAfuGfAfUfgAfuCfuUfgAfaAfL96	740	A-132629	usUfsuCfaAfgAfuCfaucAfuCfaAfgUfusug	809
AD-66336	A-132660	GfsusCfcUfgGfaCfCfAfuGfGfAfaAfaAfL96	741	A-132661	usUfsuAfuGfuCfcAfcuUfgAfaGfgAfcsasa	810
AD-66280	A-132548	GfsasCfcAfuGfgAfCfAfuAfaGfCfaAfaAfL96	742	A-132549	usUfsuAfuGfuCfcAfcuUfgAfaGfgUfcsasa	811
AD-66272	A-132532	AfsusGfgAfcAfuAfaGfGfCfaAfaGfCfaAfL96	743	A-132533	usAfsuGfcUfuAfuGfcuAfuGfuCfcAfusgsg	812
AD-66275	A-132538	GfsasAfuGfgAfaAfgGfCfaCfaAfuGfgUfuAfL96	744	A-132539	usAfsaCfcAfuUfgUfgcuUfuCfcAfuUfcsusu	813
AD-66348	A-132684	GfsasAfaGfcAfcAfaUfgGfuUfgGfaAfaAfL96	745	A-132685	usUfsuUfcCfaAfcCfaUfuGfuGfcUfuUfcsasa	814
AD-66340	A-132668	AfsasGfcAfcAfaUfgGfGfuUfgGfaAfaAfL96	746	A-132669	usGfsuUfuUfcCfaAfcCfaUfuGfuGfcUfususc	815
AD-66330	A-132648	AfsusGfgUfuGfgAfaAfaCfaGfaCfaUfuAfL96	747	A-132649	asAfsuGfcUfcUfgUfuUfuCfcAfaCfcAfusug	816
AD-66306	A-132600	GfsusUfuGfgAfaAfaCfaGfCfaAfuUfuAfL96	748	A-132601	usAfsaAfuGfcUfcUfguuUfuCfcAfaCfcAfusug	817
AD-66322	A-132632	AfsusUfuGfgCfaAfaGfCfuCfuUfgAfaAfL96	749	A-132633	usUfsuCfaGfaAfgAfcuUfgCfaAfaCfusgsc	818
AD-66274	A-132536	UfscsUfuCfuGfaAfaGfAfcAfgUfaCfuAfaAfL96	750	A-132537	usGfsuAfgUfaCfuGfcuUfcAfgAfaGfasgsc	819
AD-66271	A-132530	CfsasGfaGfuGfaUfgGfAfcGfaUfuGfgAfuAfL96	751	A-132531	usAfsuCfcAfaUfcGfcaUfcAfcUfcUfgfsusa	820
AD-66339	A-132666	CfsusUfuCfaUfuUfaAfaCfcCfaAfaUfaAfL96	752	A-132667	usGfsaUfaUfuGfgGfuAfaUfgAfaAfgsgsc	821
AD-66276	A-132540	UfsusUfcAfuUfaAfaCfcCfaAfuAfaAfL96	753	A-132541	usUfgAfaAfuUfgGfuAfaAfuGfaAfasgsg	822
AD-66281	A-132550	UfsusUfaAfcCfcAfaUfaUfcAfgAfuUfuAfL96	754	A-132551	asAfsaAfuCfuGfaUfaUfgGfuUfaAfasug	823
AD-66313	A-132614	UfsusAfaCfcCfaAfaUfaUfcAfgAfuUfuAfL96	755	A-132615	usAfsaAfaUfaUfgAfaUfcUfgGfuUfaAfasug	824
AD-66307	A-132602	GfsusGfgCfuAfuGfgGfGfuAfuUfuCfuUfuAfL96	756	A-132603	usAfsaAfgAfaAfaUfcccAfaUfgCfcAfcfsusu	825
AD-66309	A-132606	UfsusUfcUfuUfcAfaUfaUfcUfuUfaUfaAfL96	757	A-132607	usUfsuAfaUfaAfaGfuAfaGfaAfaAfasusa	826
AD-66316	A-132620	UfsusCfuUfuCfaUfaAfcUfuUfaUfaAfaAfL96	758	A-132621	usUfsuUfaAfaAfaGfuAfaUfgAfaAfaaasu	827
AD-66321	A-132630	UfscsUfuUfcAfuAfcUfuUfaUfaAfaUfuAfL96	759	A-132631	asCfsuUfuAfaUfaAfaGfuAfaAfaGfasasa	828
AD-66323	A-132634	UfsusCfaUfaCfuUfuUfaUfaAfaGfuAfaAfL96	760	A-132635	usAfsuAfcUfuUfaAfaAfaGfuAfaUfgAfasug	829
AD-66315	A-132618	CfsusUfuAfuUfaAfaGfGfuAfuCfaAfaAfL96	761	A-132619	usAfsuAfuUfgAfaUfcuUfaAfaAfaAfgsusa	830
AD-66268	A-132524	UfsusUfaUfaAfaAfgUfaUfaUfcAfaUfuAfL96	762	A-132525	usGfsaUfaUfaUfaUfaUfaUfaUfaUfaAfasug	831
AD-66332	A-132652	AfsasGfuAfuCfaAfaUfaUfcCfuCfuUfuAfL96	763	A-132653	usAfsaAfgAfgGfuAfaUfuAfuAfcUfususa	832
AD-66303	A-132594	CfsasUfuGfuCfcAfaGfAfuGfaAfaAfuAfL96	764	A-132595	usAfsuAfuUfuUfcAfcuGfgAfaAfaUfgsgsa	833
AD-66334	A-132656	AfsusGfaAfaAfaUfuUfcCfcUfgAfaAfaUfuAfL96	765	A-132657	asUfsuAfuAfuCfaGfgAfaUfuUfcAfcuscusu	834
AD-66331	A-132650	UfscsUfcCfaCfcGfAfcUfuGfcAfaAfaUfuAfL96	766	A-132651	asUfsuUfuAfuGfcAfgucCfcUfgGfaGfasusu	835
AD-66326	A-132640	CfsasCfcGfaCfuGfcAfaAfaAfaUfuGfuAfL96	767	A-132641	usAfsaAfaUfuUfaUfgucAfgUfcCfcUfgsgsa	836
AD-66312	A-132612	CfsusGfcAfaUfuGfgCfcUfuUfcUfgAfaAfL96	768	A-132613	usAfsuCfaGfaGfaAfgCfaAfuUfcAfcAfgcsasa	837
AD-66304	A-132596	GfsusAfaAfaCfaAfaUfaUfgUfaCfcUfuAfL96	769	A-132597	usAfsaGfgUfaUfaUfaUfaUfaUfaUfaUfaAfasug	838
AD-66324	A-132636	UfsasCfcUfuAfaAfaCfaUfaUfgUfaCfuAfL96	770	A-132637	usAfsuGfaCfaUfaUfguuUfaAfaGfgUfasasa	839
AD-66266	A-132520	UfsasCfaAfcAfaUfuGfgCfaUfgAfaUfuUfuAfL96	771	A-132521	asAfsaUfuCfaUfgAfaUfcuAfuGfuUfgUfasasg	840
AD-66311	A-132610	AfsusUfcUfuGfcAfaUfuCfuUfaAfaAfaAfL96	772	A-132611	usUfsuAfuUfaAfaGfaUfgAfaAfaAfcuscusu	841
AD-66335	A-132658	UfsusCfuUfgUfaUfaUfuUfuUfaUfaAfaAfL96	773	A-132659	usUfsuUfaUfaUfaGfaUfaUfaUfaUfaAfasusc	842
AD-66344	A-132676	UfscsUfuGfuCfaUfuUfcUfuUfaAfaAfcUfuAfL96	774	A-132677	asGfsuUfuAfuUfaAfaGfaUfaAfaGfasasc	843
AD-66305	A-132598	AfsusUfuGfaAfuGfuUfgGfuGfaAfaAfaAfL96	775	A-132599	usAfsuUfuUfcAfcAfcacAfuUfcAfaAfcuscusu	844
AD-66318	A-132624	GfsasAfuGfuGfuGfgUfaAfaAfaAfaGfAfaAfL96	776	A-132625	usCfsuCfuAfuUfaUfaUfaUfaUfaUfaUfaUfaAfasasa	845
AD-66308	A-132604	AfsusGfuGfuGfuGfAfaAfaAfaAfaGfgGfaAfL96	777	A-132605	usUfscCfcUfuAfuUfuUfcAfcAfcAfcAfcuscusu	846
AD-66327	A-132642	GfsusGfuGfuGfaAfaAfaAfaAfaGfgGfaAfgUfuAfL96	778	A-132643	asCfsuUfcCfcUfuAfuUfuUfcAfcAfcAfcAfcuscusu	847
AD-66337	A-132662	GfsusGfuGfaAfaAfaUfaAfaGfgGfaAfgUfuAfL96	779	A-132663	usGfsaCfuUfcCfcUfuAfuUfuUfcAfcAfcuscusu	848
AD-66347	A-132682	UfsgsUfgAfaAfaUfaAfaGfgGfaAfaGfCfaAfL96	780	A-132683	usUfsgAfcUfuCfcCfuAfuUfuUfcAfcAfcuscusu	849
AD-66269	A-132526	GfsusGfaAfaAfaAfaGfgGfaAfgUfaAfaAfL96	781	A-132527	usUfsuGfaCfuUfcCfcuAfuUfuUfcAfcuscusu	850
AD-66314	A-132616	AfsasUfaAfgGfgAfaAfaGfCfaAfgAfaUfuAfL96	782	A-132617	asAfsuCfuCfuUfgAfaUfcuUfcCfuUfaUfususu	851
AD-66265	A-132518	GfsgsGfaAfgUfaAfaGfgGfaGfaUfaAfaUfuAfL96	783	A-132519	usAfsuUfaUfaUfaUfaUfaUfaUfaUfaUfaAfcuscusu	852
AD-66310	A-132608	UfsasAfaUfgCfuGfaAfaUfuAfaUfuAfL96	784	A-132609	usAfsuUfaAfaAfaGfuucAfgCfaUfuUfasasu	853

Пример 6. Скрининг дуплексов siRNA для KNG1 in vitro.

Культура клеток и трансфекции.

Клетки Нер3b трансфицировали путем добавления 4,9 мкл Opti-MEM с 0,1 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по каталогу 13778-150) к 5 мкл дуплексов siRNA в каждой лунке в 384-луночном планшете и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем сорок мкл DMEM (Нер3b) в среде Е по Уильямсу (PMN), содержащей приблизительно  $5 \times 10^3$  клеток, добавляли в смесь siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед очисткой РНК.

Эксперименты с однократной дозой выполняли при конечной концентрации дуплекса 10 нМ и 0,01 нМ и эксперименты в отношении дозозависимого эффекта проводили в пределах диапазона конечной концентрации дуплекса от 10 нМ до 36 фМ с использованием 8-, 6-кратных разведений.

Выделение общей РНК с применением набора "DYNABEADS mRNA Isolation Kit".

РНК выделяли при помощи автоматизированного протокола на платформе BioTek-EL406 с применением парамагнитных микрочастиц DYNABEADS (Invitrogen, № по каталогу 61012). Вкратце, 50 мкл смеси лизирующего/связывающего буфера и 25 мкл лизирующего буфера, содержащего 3 мкл магнитных гранул, вносили в планшет с клетками. Планшеты инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем магнитные гранулы фиксировали и удаляли супернатант. Связанную с гранулами РНК затем промывали 2 раза 150 мкл промывочного буфера А и однократно промывочным буфером В. Гранулы затем промывали 150 мкл элюирующего буфера, повторно фиксировали и удаляли супернатант.

Синтез кДНК с использованием набора для обратной транскрипции ABI High capacity cDNA reverse

transcription kit (Applied Biosystems, Форстер-Сити, Калифорния, № по кат. 4368813).

Десять мкл мастер-микса, содержащего 1 мкл 10× буфера, 0,4 мкл 25× dNTP, 1 мкл 10× случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 6,6 мкл H<sub>2</sub>O на реакцию, добавляли к РНК, выделенной как описано выше. Планшеты запечатывали, перемешивали и инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего в течение 2 ч при 37°C. Планшеты затем инкубировали при 81°C в течение 8 мин.

ПЦР в режиме реального времени.

Два мкл кДНК добавляли в мастер-микс, содержащий 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH (Hs99999905\_ml или 4352339E), 0,5 мкл зонда для F12 (Hs00166821 или Mm00491349) и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № по каталогу 04887301001) на лунку в 384-луночные планшеты (Roche, № по каталогу 04887301001). ПЦР в режиме реального времени выполняли с применением системы LightCycler480 для ПЦР в режиме реального времени (Roche) с применением ΔΔCt (RQ)-анализа. Каждый дуплекс исследовали в четырех независимых трансфекциях.

Для расчета относительного кратного изменения данные E реальном времени анализировали с использованием способа AACt и нормализовали относительно анализов, выполненных с клетками, трансфицированными 10 нМ AD-1955, или с ложно-трансфицированными клетками. Значения IC<sub>50</sub> рассчитывали с применением модели подбора по 4 параметрам с использованием XLFit и нормализовали относительно данных для клеток, трансфицированных AD-1955, контролем, не осуществляющим целенаправленное воздействие, или интактных клеток.

Смысловая и антисмысловая последовательности AD-1955 представляют собой

Смысловая: cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT (SEQ ID NO: 2343);

Антисмысловая: UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT (SEQ ID NO: 2344).

В табл. 17 приведены результаты скрининга в отношении однократной дозы в клетках Hep3b, трансфицированных указанными iRNA для KNG1 человека. В табл. 18 приведены результаты скрининга в отношении дозозависимого эффекта в клетках Hep3b, трансфицированных указанными iRNA для KNG1 человека. Данные выражены в виде процента остаточной мРНК в сравнении с AD-1955.

Таблица 17. Скрининг в отношении однократной дозы для KNG1 в Hep3b

ID дуплекса	10 нМ, средн.	0,1 нМ, средн.	10 нМ, станд. отклон.	0,1 нМ, станд. отклон.
AD-66259	5	30,8	1,4	12,6
AD-66261	14,5	74,9	4,5	37,1
AD-66262	14,4	40,4	12,7	19,8
AD-66263	23,8	87,4	33,9	20,6

## 045013

AD-66260	42,4	78,7	12,8	20,7
AD-66341	30	88,9	11,8	20,6
AD-66345	79,5	180	9,2	57,7
AD-66328	75,1	74,5	16,8	13,5
AD-66317	30,4	71,5	6,4	19,6
AD-66333	66	90,7	23,5	31,4
AD-66338	74,2	123,7	30,4	35,3
AD-66343	69	86,9	27,3	24
AD-66319	70,9	93,6	10,7	26,8
AD-66346	68,2	184,8	5,5	55,7
AD-66329	73,5	104,6	15,6	15,5
AD-66270	96,1	80,5	51,4	22,4
AD-66279	54,7	75,7	28,6	21,5
AD-66273	141,2	71,9	26,9	12,9
AD-66264	82,6	92,3	43,5	25,1
AD-66342	55,9	91,6	12,4	8,5
AD-66278	77,4	62,2	23,9	17,4
AD-66277	56,5	86	41,7	31,8
AD-66267	56,1	68,7	22,4	15,6
AD-66325	40,3	60,8	13,5	19,2
AD-66320	70,4	99,5	16,5	6,2
AD-66336	102,7	94,4	26,6	21,3
AD-66280	71,9	94,8	32,4	19,9
AD-66272	150,9	241,6	43,7	195,8
AD-66275	49,3	100,4	12	40,6
AD-66348	64,8	117,2	17,2	21,5
AD-66340	56,7	85,1	15,7	26,4
AD-66330	61,5	97,1	12,4	24,9
AD-66306	36,1	68,4	8,2	14
AD-66322	59,9	84,4	14,4	28,8
AD-66274	109,6	88,2	48	17,3
AD-66271	130,9	70,1	25,3	20,9
AD-66339	68,4	107,4	29,3	27,7
AD-66276	40,6	85	8,8	31

AD-66281	111,1	89,8	54,8	27,2
AD-66313	57,1	112,6	8,5	35,9
AD-66307	37,2	70,4	10	5,4
AD-66309	42,7	58,8	9,4	11,5
AD-66316	42,2	75,3	10,3	9,9
AD-66321	63,8	106,1	28	32,4
AD-66323	68,7	89	16,3	21,4
AD-66315	41,4	87,5	7,2	10,8
AD-66268	81,1	55	34,2	5,6
AD-66332	59,6	74,6	22,8	22,8
AD-66303	63,3	52,3	9,6	7,1
AD-66334	47,7	72,7	11,9	36,2
AD-66331	51,1	98,1	13,6	33,5
AD-66326	53	58,9	5,7	11,7
AD-66312	76	90,8	16,2	19,8
AD-66304	85,5	54,3	12,4	4,3
AD-66324	49,5	63,4	8,2	4,7
AD-66266	118,3	185,1	21,2	42,8
AD-66311	59	68,6	4,3	15,5
AD-66335	65,8	74,3	9,6	28,2
AD-66344	113,2	110,1	41,2	37,7
AD-66305	62,5	100,6	18,1	32,7
AD-66318	56,5	60,4	12,5	5,2
AD-66308	43,7	65,6	12	12,9
AD-66327	58,5	65,8	11,9	9,2
AD-66337	102,8	156,4	41,6	32,7
AD-66347	78,4	105,7	25,9	24,3
AD-66269	66,2	85,1	20,4	15
AD-66314	49,6	98,3	8,9	25,3
AD-66265	109,9	177,7	40,1	57,8
AD-66310	42,1	73,4	7	27,5

Таблица 18. Скрининг в отношении дозозависимого эффекта для KNG1 в Нер3b

ID дуплекса	IC <sub>50</sub> (нМ)
AD-66259	0,035
AD-66261	1,02
AD-66262	0,04
AD-66263	0,299
AD-66341	9,181

Пример 7. In vivo сайленсинг KLKB1, F12 и KNG1 у мышей дикого типа.

Для дополнительной оценки были выбраны три наиболее активных средства, целенаправленно воздействующих на KLKB1, описанных выше, три наиболее активных средства, целенаправленно воздействующих на F12, описанных выше, и два наиболее активных средства, целенаправленно воздействующих на KNG1, описанных выше. В частности, дополнительные средства, целенаправленно воздействующие на нуклеотиды 1661-1682, или нуклеотиды 1905-1926, или нуклеотиды 382-403 NM\_000892 (ген KLKB1) (фиг. 7), дополнительные средства, целенаправленно воздействующие на нуклеотиды 2017-2040, или нуклеотиды 315-338, или нуклеотиды 438-459 NM\_000505 (ген F12) (фиг. 8), и дополнительные средства, целенаправленно воздействующие на нуклеотиды 301-324 или нуклеотиды 822-845 NM\_001166451 (ген KNG1) (фиг. 9), синтезировали как описано выше. In vivo эффективность этих дополнительных средств оценивали путем введения однократной подкожной дозы средства мышам C57BL/6 дикого типа и определения уровня мРНК в дни 7-10 после введения дозы. Немодифицированные нуклеотидные последова-

тельности смысловой и антисмысловой нитей средств, представленных на фиг. 7, целенаправленно воздействующих на KLKB1, приведены в табл. 19А, а модифицированные нуклеотидные последовательности смысловой и антисмысловой нитей средств, представленных на фиг. 7, приведены в табл. 19В. Немодифицированные нуклеотидные последовательности смысловой и антисмысловой нитей средств, представленных на фиг. 8, целенаправленно воздействующих на F12, приведены в табл. 19С, а модифицированные нуклеотидные последовательности смысловой и антисмысловой нитей средств, представленных на фиг. 8, приведены в табл. 19D. Немодифицированные нуклеотидные последовательности смысловой и антисмысловой нитей средств, представленных на фиг. 9, целенаправленно воздействующих на KNG1, приведены в табл. 19Е, а модифицированные нуклеотидные последовательности смысловой и антисмысловой нитей средств, представленных на фиг. 9, приведены в табл. 19F.

В частности, в отношении дополнительных средств, целенаправленно воздействующих на ген KLKB1, мышам C57BL/6 дикого типа вводили однократную дозу 1 или 3 мг/кг средства и определяли уровень мРНК KLKB1 в дни 7-10 после введения дозы. Результаты этих анализов приведены на фиг. 1, на которой продемонстрировано, что AD-66948 был наиболее эффективным средством, целенаправленно воздействующим на тестируемый ген KLKB1.

В отношении дополнительных средств, целенаправленно воздействующих на F12, мышам C57BL/6 дикого типа вводили или однократную дозу 1 мг/кг, или однократную дозу 3 мг/кг, или однократную дозу 1 мг/кг, или однократную дозу 10 мг/кг средства и определяли уровень мРНК F12 в дни 7-10 после введения дозы. Результаты этих анализов приведены на фиг. 2, на которой продемонстрировано, что AD-67244 был наиболее эффективным средством, целенаправленно воздействующим на тестируемый ген F12.

В отношении дополнительных средств, целенаправленно воздействующих на ген KNG1, мышам C57BL/6 дикого типа вводили однократную дозу 1 или 3 мг/кг средства и определяли уровень мРНК KNG1 в дни 7-10 после введения дозы. Результаты этих анализов приведены на фиг. 3, на которой продемонстрировано, что AD-67344 был наиболее эффективным средством, целенаправленно воздействующим на тестируемый ген KNG1.

Таблица 19А. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей средств, целенаправленно воздействующих на KLKB1

Название дуплекса	Мишень	Положение сайта инициации транскрипции антисмысловой нити мРНК	Положение смысловой последовательности в соответствии с эталонной последовательностью из GenBank	Положение антисмысловой последовательности в соответствии с эталонной последовательностью из GenBank	Последовательность смысловой нити	SEQ ID NO	Последовательность антисмысловой нити	SEQ ID NO
AD-65077	KLKB1	1659	NM_000892,3_1661-1681_s	NM_000892,3_1659-1681_as	AAUCCAAAAUUAUUCUACAAAA	854	UUUUUGAAGAAUUAUUUGGAUUUC	863
AD-66944	KLKB1	1659	NM_000892,3_1661-1681_s	NM_000892,3_1659-1681_as	AAUCCAAAAUUAUUCUACAAAA	855	UUUUUGAAGAAUUAUUUGGAUUUC	864
AD-66945	KLKB1	1659	NM_000892,3_1661-1681_s	NM_000892,3_1659-1681_as	AAUCCAAAAUUAUUCUACAAAA	856	UUUUUGAAGAAUUAUUUGGAUUUC	865
AD-65087	KLKB1	1903	NM_000892,3_1905-1925_s	NM_000892,3_1903-1925_as	ACCAAAGUCGCGAGUACAUA	857	UAUGUACUCAGCGACUUUGGUGU	866
AD-66946	KLKB1	1903	NM_000892,3_1905-1925_s	NM_000892,3_1903-1925_as	ACCAAAGUCGCGAGUACAUA	858	UAUGUACUCAGCGACUUUGGUGU	867
AD-66947	KLKB1	1903	NM_000892,3_1905-1925_s	NM_000892,3_1903-1925_as	ACCAAAGUCGCGAGUACAUA	859	UAUGUACUCAGCGACUUUGGUGU	868
AD-65103	KLKB1	380	NM_000892,3_382-402_s	NM_000892,3_380-402_as	GUGGUCAUCAAUAAGUGCUU	860	AAGCACUUUAUUUGAUGACCACAU	869
AD-66948	KLKB1	380	NM_000892,3_382-402_s	NM_000892,3_380-402_as	GUGGUCAUCAAUAAGUGCUU	861	AAGCACUUUAUUUGAUGACCACAU	870
AD-66949	KLKB1	380	NM_000892,3_382-402_s	NM_000892,3_380-402_as	GUGGUCAUCAAUAAGUGCUU	862	AAGCACUUUAUUUGAUGACCACAU	871

Таблица 19В. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей средств, целенаправленно воздействующих на KLKB1

Название дуплекса	Мишень	Положение сайта инициации транскрипции антисмысловой нити МРНК	Положение смысловой последовательности в соответствии с эталонной последовательностью из GenBank	Положение антисмысловой последовательности в соответствии с эталонной последовательностью из GenBank	Последовательность смысловой нити	SEQ ID NO	Последовательность антисмысловой нити	SEQ ID NO
AD-65077	KLKB1	1659	NM_000892,3_1661-1681_s	NM_000892,3_1659-1681_as	AfsasUfcCfaAfaAFuFafUfcUfaCfaAfaAfL96	872	usUfsuUfgUfaGfaAfaUuUfuUfgGfaUfususc	881
AD-66944	KLKB1	1659	NM_000892,3_1661-1681_s	NM_000892,3_1659-1681_as	asasuccaAfaAFuFafuucacaaaL96	873	usUfsuugUfaGfaAfaUuUfuUfggauususc	882
AD-66945	KLKB1	1659	NM_000892,3_1661-1681_s	NM_000892,3_1659-1681_as	asasuccaAfaAFuFafuucacaaaL96	874	UfsUfsuugUfaGfaAfaUuUfuUfggauususc	883
AD-65087	KLKB1	1903	NM_000892,3_1905-1925_s	NM_000892,3_1903-1925_as	AfscsCfaAfaGfuCfGfCfugafGfaGfuAfcAfUfL96	875	usAfsuGfuAfcUfcAfgcgAfcUfuUfgGfusgsu	884
AD-66946	KLKB1	1903	NM_000892,3_1905-1925_s	NM_000892,3_1903-1925_as	ascscaaaGfuCfGfCfugaguacauaL96	876	usAfsuguAfcUfcfagcgAfcUfuuggusgsu	885
AD-66947	KLKB1	1903	NM_000892,3_1905-1925_s	NM_000892,3_1903-1925_as	ascscaaaGfuCfGfCfugaguacauaL96	877	UfsAfsuguAfcUfcfagcgAfcUfuuggusgsu	886
AD-65103	KLKB1	380	NM_000892,3_382-402_s	NM_000892,3_380-402_as	GfsusGfgUfcAfuCFAfafaUfaAfgUfgCfuUfL96	878	asAfsGcfaCfuUfaUfuugAfuGfaCfcAfcasau	887
AD-66948	KLKB1	380	NM_000892,3_382-402_s	NM_000892,3_380-402_as	gsusggucAfuCfAfaAfaaagugcuuL96	879	asAfsGcaCfuUfaUfuugAfuGfaccacsasu	888
AD-66949	KLKB1	380	NM_000892,3_382-402_s	NM_000892,3_380-402_as	gsusggucAfuCfAfaAfaaagugcuuL96	880	AfsAfsGcaCfuUfaUfuugAfuGfaccacsasu	889

Таблица 19С. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей средств, целенаправленно воздействующих на F12

Название дуплекса	Мишень	Положение сайта инициации транскрипции антисмысловой нити МРНК	Положение смысловой последовательности в соответствии с эталонной последовательностью из GenBank	Положение антисмысловой последовательности в соответствии с эталонной последовательностью из GenBank	Последовательность смысловой нити	SEQ ID NO	Последовательность антисмысловой нити	SEQ ID NO
AD-66121	F12	2018	NM_000505,3_2020-2040_s	NM_000505,3_2018-2040_as	AACUCAUAAAAGUGCUUUGAA	890	UUCAAAAGCACUUUAUUGAGUUUC	898
AD-67244	F12	2018	NM_000505,3_2020-2040_s	NM_000505,3_2018-2040_as	AACUCAUAAAAGUGCUUUGAA	891	UUCAAAAGCACUUUAUUGAGUUUC	899
AD-67245	F12	2018	NM_000505,3_2020-2040_s	NM_000505,3_2018-2040_as	AACUCAUAAAAGUGCUUUGAA	892	UUCAAAAGCACUUUAUUGAGUUUC	900
AD-66125	F12	316	NM_000505,3_318-338_s	NM_000505,3_316-338_as	AGCCCAAGAAAGUGAAAGACA	893	UGUCUUUCACUUUCUUGGGCUCC	901
AD-67246	F12	2023	NM_000505,3_2025-2045_s	NM_000505,3_2023-2045_as	AAUAAAAGUGCUUUGAAAACGU	894	ACGUUUUCAAGACACUUUAUUGA	902
AD-67247	F12	2023	NM_000505,3_2025-2045_s	NM_000505,3_2023-2045_as	AAUAAAAGUGCUUUGAAAACGU	895	ACGUUUUCAAGACACUUUAUUGA	903
AD-67248	F12	438	NM_000029,3_440-460_s	NM_000029,3_438-460_as	CAGAAAAGAGAGUGCUUUGAA	896	UUCAAAAGCACUUCUUCUUGGCC	904
AD-67249	F12	438	NM_000029,3_440-460_s	NM_000029,3_438-460_as	CAGAAAAGAGAGUGCUUUGAA	897	UUCAAAAGCACUUCUUCUUGGCC	905

Таблица 19D. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей средств, целенаправленно воздействующих на F12

Название дуплекса	Мишень	Положение сайта инициации транскрипции антисмысловой нити МРНК	Положение смысловой последовательности в соответствии с эталонной последовательностью из GenBank	Положение антисмысловой последовательности в соответствии с эталонной последовательностью из GenBank	Последовательность смысловой нити	SEQ ID NO	Последовательность антисмысловой нити	SEQ ID NO
AD-66121	F12	2018	NM_000505,3_20-2040_s	NM_000505,3_2018-2040_as	AfsasCfuCfaAfuAfAfAfAfUfgCfuUfuGfaAfL96	906	usUfscAfaAfgCfaCfuuuAfuUfgAfgUfususc	914
AD-67244	F12	2018	NM_000505,3_20-2040_s	NM_000505,3_2018-2040_as	asascucaAfuAfAfAfAfugcucuugaaL96	907	usUfscAAfGcFafcuuuAfuUfgaguususc	915
AD-67245	F12	2018	NM_000505,3_20-2040_s	NM_000505,3_2018-2040_as	asascucaAfuAfAfAfAfugcucuugaaL96	908	UfsUfscAAfGcFafcuuuAfuUfgaguususc	916
AD-66125	F12	316	NM_000505,3_318-338_s	NM_000505,3_316-338_as	AfsgsCfcCfaAfgAfAfAfUfgAfaAfgAfcAfL96	909	usGfsuCfuUfuCfaCfuuuCfuUfgGfgCfususc	917
AD-67246	F12	2023	NM_000505,3_2025-2045_s	NM_000505,3_2023-2045_as	asasuaaaGfuGfCfUfuugaaaacguL96	910	asCfsguuUfuCfaAaagCfCfuuuuugsga	918
AD-67247	F12	2023	NM_000505,3_2025-2045_s	NM_000505,3_2023-2045_as	asasuaaaGfuGfCfUfuugaaaacguL96	911	AfsCfsguuUfuCfaAaagCfCfuuuuugsga	919
AD-67248	F12	438	NM_000029,3_440-460_s	NM_000029,3_438-460_as	csasgaaaGfaGfAfAfugcucuugaaL96	912	usUfscAAfGcFafcuucUfcUfuucugsgsc	920
AD-67249	F12	438	NM_000029,3_440-460_s	NM_000029,3_438-460_as	csasgaaaGfaGfAfAfugcucuugaaL96	913	UfsUfscAAfGcFafcuucUfcUfuucugsgsc	921

Таблица 19E. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей средств, целенаправленно воздействующих на KNG1

Название дуплекса	Мишень	Положение сайта инициации транскрипции антисмысловой нити МРНК	Положение смысловой последовательности в соответствии с эталонной последовательностью из GenBank	Положение антисмысловой последовательности в соответствии с эталонной последовательностью из GenBank	Последовательность смысловой нити	SEQ ID NO	Последовательность антисмысловой нити	SEQ ID NO
AD-66259	KNG1	302	NM_000893,3_304-324_s	NM_000893,3_302-324_as	GAGGAAAUGACUGCAAUGAA	922	UUCAUUGCAGUCAAUUCCUCGG	928
AD-67344	KNG1	302	NM_000893,3_304-324_s	NM_000893,3_302-324_as	GAGGAAAUGACUGCAAUGAA	923	UUCAUUGCAGUCAAUUCCUCGG	929
AD-67345	KNG1	302	NM_000893,3_304-324_s	NM_000893,3_302-324_as	GAGGAAAUGACUGCAAUGAA	924	UUCAUUGCAGUCAAUUCCUCGG	930
AD-66262	KNG1	823	NM_000893,3_825-845_s	NM_000893,3_823-845_as	UACCUACUCAAUUGUCAAAA	925	UUUUGCACAUAUUGAGUAGGUAU	931
AD-67346	KNG1	823	NM_000893,3_825-845_s	NM_000893,3_823-845_as	UACCUACUCAAUUGUCAAAA	926	UUUUGCACAUAUUGAGUAGGUAU	932
AD-67347	KNG1	823	NM_000893,3_825-845_s	NM_000893,3_823-845_as	UACCUACUCAAUUGUCAAAA	927	UUUUGCACAUAUUGAGUAGGUAU	933

Таблица 19F. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей средств, целенаправленно воздействующих на KNG1

Название дуплекса	Мишень	Положение сайта инициации транскрипции антисмысловой нити мРНК	Положение смысловой последовательности в соответствии с эталонной последовательностью из GenBank	Положение антисмысловой последовательности в соответствии с эталонной последовательностью из GenBank	Последовательность смысловой нити	SEQ ID NO	Последовательность антисмысловой нити	SEQ ID NO
AD-66259	KNG1	302	NM_000893, 3_304-324_s	NM_000893, 3_302-324_as	GfsasGfgAfaAfuUfgfAfcUfgCfaAfuGfaAfL96	934	usUfscAfuUfgCfaGfucaAfuUfuCfcUfcsgsg	940
AD-67344	KNG1	302	NM_000893, 3_304-324_s	NM_000893, 3_302-324_as	gsasggaaAfuUfgfAfcugcaaugaaL96	935	usUfscAuUfgCfAfgucaAfuUfuccucsgay	941
AD-67345	KNG1	302	NM_000893, 3_304-324_s	NM_000893, 3_302-324_as	gsasggaaAfuUfgfAfcugcaaugaaL96	936	UfsUfscAuUfgCfAfgucaAfuUfuccucsgsg	942
AD-66262	KNG1	823	NM_000893, 3_825-845_s	NM_000893, 3_823-845_as	UfsasCfcUfaCfuCfAfaAfuUfgUfgCfaAfaAfL96	937	usUfsuUfgCfaCfaAfuugAfgUfaGfgUfasasu	943
AD-67346	KNG1	823	NM_000893, 3_825-845_s	NM_000893, 3_823-845_as	usasccuaCfuCfAfaAfuugugcaaaaL96	938	usUfsuugCfaCfAfaugAfgUfagguasasu	944
AD-67347	KNG1	823	NM_000893, 3_825-845_s	NM_000893, 3_823-845_as	usasccuaCfuCfAfaAfuugugcaaaaL96	939	UfsUfsuugCfaCfAfaugAfgUfagguasasu	945

Пример 8. In vivo сайленсинг KLKB1, F12 и KNG1 в мышинной модели, проницаемости сосудов, индуцируемой ингибитором АСЕ

Для определения in vivo эффективности однократной дозы поднабора описанных выше средств для снижения уровней мРНК KLKB1, F12 или KNG1 человека самкам мышей C57BL/6 дикого типа подкожно вводили однократную дозу 0, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг AD-66948 (целенаправленно воздействующего на KLKB1), или однократную дозу 0, 0,1, 0,3, 1 или 3 мг/кг AD-67244 (целенаправленно воздействующего на F12), или однократную дозу 0, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг AD-67344 (целенаправленно воздействующего на KNG1). В день 7 после введения дозы животным внутривенно вводили 2,5 мг/кг ингибитора ангиотензин-конвертирующего фермента (АСЕ), каптоприла, с целью индуцирования проницаемости сосудов. Через пятнадцать минут после введения каптоприла животным внутривенно вводили 30 мг/кг синего красителя Эванса. Через пятнадцать минут после введения синего красителя Эванса животных умерщвляли и собирали образцы крови, кишечника и печени. Синий краситель Эванса выделяли и количественно определяли в образцах крови и кишечника и в образцах печени определяли уровни целевой мРНК.

Результаты этих анализов с применением средства, целенаправленно воздействующего на KLKB1 (AD-66948), показаны на фиг. 4. Результаты этих анализов с применением средства, целенаправленно воздействующего на F12 (AD-AD-67244), показаны на фиг. 5. Результаты этих анализов с применением средства, целенаправленно воздействующего на KNG1 (AD-AD-67344), показаны на фиг. 6.

Пример 9. Синтез и in vitro скрининг дуплексов siRNA для F12.

Дополнительные средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующие на F12, конструировали, синтезировали и подвергали скринингу в отношении in vitro эффективности, как описано выше. Подробный перечень дополнительных немодифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей F12 показан в табл. 20. Подробный перечень дополнительных модифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей F12 показан в табл. 21. В табл. 22 приведены результаты скрининга в отношении однократной дозы в клетках Hep3b, трансфицированных дополнительными iRNA для F12. Данные выражены в виде процента остаточной мРНК в сравнении с AD-1955.

Таблица 20. Немодифицированные последовательности F12

Название дуплекса	Смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO	Положение в NM_000505.3	Антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO	Положение в NM_000505.3
AD-70653	GACUCCUGGAUAGGCAGCU	946	12-30	AGCUGCCUAUCCAGGAGUC	1130	12-30
AD-70654	UAGGCAGCUGGACCAACGA	947	22-40	UCGUUGGUCCAGCUGCCUA	1131	22-40
AD-70655	ACCAACGGACGGAUCCAU	948	33-51	AUGGCAUCCGUCCGUUGGU	1132	33-51
AD-70656	AUGCCAUGAGGGCUCUGCU	949	45-63	AGCAGAGCCCUCAUGGCAU	1133	45-63
AD-70657	GCUCUGCUGCUCUGGGGU	950	56-74	ACCCCAGGAGCAGCAGAGC	1134	56-74
AD-70658	UCCUGGGUUCUGCUGGU	951	66-84	ACCAGCAGGAACCCAGGA	1135	66-84
AD-70659	CUGCUGGUGAGCUUGGAGU	952	77-95	ACUCCAAGCUCACCAGCAG	1136	77-95
AD-70660	CUUGGAGUCAACACUUUCA	953	88-106	UGAAAGUGUUGACUCCAAG	1137	88-106
AD-70661	ACUUUCAGAUCCACUUUGA	954	100-118	UCAAGGUGGAAUCGAAAGU	1138	100-118
AD-70662	CCACCUUGGGGAGCCCCA	955	110-128	UGGGGGUUCCAAGGUGG	1139	110-128
AD-70663	GCCCCAAGGAGCAUAGU	956	122-140	ACUUAUGCUCUUGGGGGC	1140	122-140
AD-70664	CAUAAAGUACAAGCUGAAA	957	134-152	UUUCAGCUUUGUACUUUG	1141	134-152
AD-70665	AAGCUGAAGGACACACAGU	958	144-162	ACUGUGCUCUUCAGCUU	1142	144-162
AD-70666	ACACAGUCGUUCACUGU	959	156-174	ACAGUGAGAAGCAGUGUGU	1143	156-174
AD-70667	UUCUCACUGUCACCGGGGA	960	165-183	UCCCCGGUGACAGUGAGAA	1144	165-183
AD-70668	ACCGGGGAGCCUGCCACU	961	176-194	AGUGGCAAGGGCUCGCCGU	1145	176-194
AD-70669	UGCCACUCCCCUCCAGU	962	188-206	ACUGGAAGGGGAGUGGCA	1146	188-206
AD-70670	UUCAGUACCACCGGAGU	963	200-218	UCUGCCGGUGGUACUGGAA	1147	200-218
AD-70671	ACCGGCAGCUGUACCACA	964	210-228	UUGUGUACAGCUGCCGGU	1148	210-228
AD-70672	UACCACAAUUAACCCACA	965	221-239	UGUGGUACAUUUGUGGUA	1149	221-239
AD-70673	UACCACAAAGGGCCGGCCA	966	232-250	UGGCCGGCCUUGUGGGUA	1150	232-250
AD-70674	GCCGGCCAGGCCUCAGCA	967	243-261	UGCUGAGGGCCUGGCCGGC	1151	243-261
AD-70675	CUCAGCCUUGGUGUCUAA	968	255-273	UUAGCACACCAGGGCUGAG	1152	255-273
AD-70676	UGUGCUACCACCCCAACU	969	266-284	AGUUGGGGUGGUAGCACA	1153	266-284
AD-70677	ACCCCCAACUUUGAUCA	970	275-293	UCUGAUCAAAGUUGGGGU	1154	275-293
AD-70678	AUCAGGACCAGCGAUGGGA	971	288-306	UCCCAUCGUGGUCCUGAU	1155	288-306
AD-70679	AGCGAUGGGGUAUCUGUU	972	297-315	AAACAGUAUCCCCAUCGCU	1156	297-315
AD-70680	UACUUGUUUGGAGCCCAAG	973	308-326	UCUUUGGGUCCAAACAGUA	1157	308-326
AD-70681	CCAAGAAAGUGAAAGACCA	974	321-339	UGGUCUUUACAUUUUCUUGG	1158	321-339
AD-70682	AAAGACCACUGCAGCAAAC	975	332-350	GUUUGCUGCAGUGGUCUUU	1159	332-350
AD-70683	UGCAGCAAACACAGCCCU	976	341-359	AGGGGCUUGUUUGCUGCA	1160	341-359
AD-70684	AGCCCCUGCCAGAAAGGAA	977	353-371	UUCCUUUCUGGAGGGGCU	1161	353-371
AD-70685	AGAAAGGAGGGACCUUGU	978	363-381	ACACAGGUCCCUUUUCU	1162	363-381
AD-70686	ACCUUGUGAACAUGCCAA	979	374-392	UUGGCAUGUACACAGGU	1163	374-392
AD-70687	AUGCCAAGCGCCCCACU	980	386-404	AGUGGGGGCCGUUGGCAU	1164	386-404
AD-70688	GCCCCACUGUCUGUCA	981	396-414	UGACAGAGACAGUGGGGC	1165	396-414
AD-70689	CACCUACUGGAAACCACU	982	419-437	AGUGGUUCCAGUGAGGUG	1166	419-437
AD-70690	AACCACUGCCAGAAAGAGA	983	431-449	UCUCUUUCUGGAGUGGUU	1167	431-449
AD-70691	CAGAAAGAGAAGUCUUUA	984	440-458	UAAAGCACUUCUUCUUG	1168	440-458
AD-70692	UGCUUUGAGCCUACGUUA	985	452-470	UAAGCUGAGGCUCAAAGCA	1169	452-470
AD-70693	CAGCUUCUCCGGUUUUUCA	986	464-482	UGAAAAACCGGAGAAGCUG	1170	464-482
AD-70694	CGGUUUUCCACAAGAAUA	987	473-491	UAUUCUUGUGGAAAAACCG	1171	473-491
AD-70695	CAAGAAUGAGAUUUGGUU	988	484-502	AUACCAUAUCUAUUCUUG	1172	484-502
AD-70696	UAUGGUUAGAACUGAGCA	989	495-513	UGCUCAGUUCUAUACCAUA	1173	495-513
AD-70697	UGAGCAAGCAGCUGGGCA	990	508-526	UGCCACAGCUGCUUGCUCA	1174	508-526
AD-70698	GCUGUGGCCAGAUCCAGU	991	518-536	ACUGGCAUCUGGCCACAGC	1175	518-536
AD-70699	AUGCCAGUGCAAGGGUCCU	992	529-547	AGGACCCUUGCACUGGCAU	1176	529-547
AD-70700	AAGGGUCCUGAGCCACU	993	539-557	AGUGGGCAUCAGGACCCUU	1177	539-557
AD-70701	UGCCACUGCCAGCGGCCUA	994	550-568	UAGCCGUGGCAGUGGGCA	1178	550-568
AD-70702	CGGCUGGCCAGCCAGGCCU	995	563-581	AGGCCUGGCUGGCCAGCCG	1179	563-581

## 045013

AD-70703	AGCCAGGCCUGCCGACCA	996	572-590	UGGUGCGGCAGGCCUGGCU	1180	572-590
AD-70704	CGCACCACCCGUGCCUCA	997	584-602	UGAGGCACGGGUUGGUGCG	1181	584-602
AD-70705	UGCCUCCAUGGGGUGCGU	998	596-614	AGCGACCCCAUGGAGGCA	1182	596-614
AD-70706	GGGGUCGUGCCUAGAGGU	999	606-624	ACCUCUAGGCAGCGACCCC	1183	606-624
AD-70707	CUAGAGGGGGAGGGCCACA	1000	617-635	UGGGGCCUCCACCUCUAG	1184	617-635
AD-70708	AGGGCCACCGCCUGUGCCA	1001	627-645	UGGCACAGGGGGGCGCCU	1185	627-645
AD-70709	UGUGCCACUGCCCGGUGGA	1002	639-657	UCCACCGGGCAGUGGCACA	1186	639-657
AD-70710	CGGUGGGCUACCCGGAGA	1003	651-669	UCUCCGGUGUAGCCACCG	1187	651-669
AD-70711	ACCGAGGACUUCUGCGACA	1004	662-680	UGUCGCAGAAGGCUCCGGU	1188	662-680
AD-70712	UUCUGCGACGUGGACACCA	1005	671-689	UGGUGUCCACGUCGAGAA	1189	671-689
AD-70713	GACACCAAGGCAAGUCGU	1006	683-701	AGCAGCUUGCCUUGGUGUC	1190	683-701
AD-70714	CAAGCUCUAUAGUAGGCCA	1007	693-711	UGGCCAUCAUAGCAGCUUG	1191	693-711
AD-70715	GAUGGCCCGGGCUCAGCU	1008	704-722	AGCUGAGCCCGGGCCAUUC	1192	704-722
AD-70716	UCAGCUACCGCGCCUGGA	1009	717-735	UCCAGGCCCGGGUAGCUGA	1193	717-735
AD-70717	CGGCCUGGCCAGGACCACA	1010	727-745	UGUGGUCCUGGCCAGGCGG	1194	727-745
AD-70718	AGGACCACGUCUCGGGUA	1011	737-755	UACCCAGAGCGUGGUCCU	1195	737-755
AD-70719	UCGGGUGCGCCUUGCAGA	1012	749-767	UCUGACAGGGCGCACCCGA	1196	749-767
AD-70720	CUGUCAGCCGUGGGCCUCA	1013	760-778	UGAGGCCACGGCUGACAG	1197	760-778
AD-70721	UGGGCCUCGGAGGCCACCU	1014	770-788	AGGUGGCCUCGGAGGCCCA	1198	770-788
AD-70722	CCACCUACCGGAACGUGAA	1015	783-801	UUCACGUUCCGGUAGGUGG	1199	783-801
AD-70723	AACGUGACUGCCGAGCAAA	1016	794-812	UUUGCUCGGCAGUCACGUU	1200	794-812
AD-70724	CGAGCAAGCGCGAACUGA	1017	805-823	UCAGUUCGGCGUUGCUCG	1201	805-823
AD-70725	CGGAACUGGGGACUGGGCA	1018	815-833	UGCCAGUCCCGAGUCCG	1202	815-833
AD-70726	GACUGGGCGGCCACGCCUU	1019	825-843	AAGGCUGGGCCGCCAGUC	1203	825-843
AD-70727	ACGCCUUCUGCCGGAACCA	1020	837-855	UGGUUCCGGCAGAGGCGU	1204	837-855
AD-70728	CGGAACCCGGACAACGACA	1021	848-866	UGUCGUUUGCCGGUUCG	1205	848-866
AD-70729	AACGACAUCGCCCGUGGU	1022	860-878	ACCACGGGGGAGUUCGUU	1206	860-878
AD-70730	GCCCGUGGUGUUCGUGCU	1023	870-888	AGCACGAAGCACCCAGGGC	1207	870-888
AD-70731	UUCGUGUGAACCAGGACA	1024	881-899	UGUCGCGGUUCAGCACGAA	1208	881-899
AD-70732	ACCGCAGCCGGUCGAGCUA	1025	891-909	UAGCUCAGCCGGUCGCGGU	1209	891-909
AD-70733	CUGAGCUGGGAGUACUGCA	1026	902-920	UGCAGUACUCCAGCUCAG	1210	902-920
AD-70734	UACUUGGACACUAGGACAGU	1027	914-932	ACUUGUCCAGGUCGAGUA	1211	914-932
AD-70735	UGGCACAGUGCCAGACCCA	1028	924-942	UGGGUCUGGCACUGUGCCA	1212	924-942
AD-70736	AGACCCCAACCGAGGGGA	1029	936-954	UCCGCCUGGGUUGGGUCU	1213	936-954
AD-70737	AGGCGGGCCUCCGACCCA	1030	948-966	UGGGUCGGAGGGCGCCCU	1214	948-966
AD-70738	UCCGACCCCGGUGUCCCU	1031	958-976	AGGGGACACCGGGGUCGGA	1215	958-976
AD-70739	UGUCCCUAGGCUUCAUGU	1032	969-987	ACAUGAAGCCUAGGGGACA	1216	969-987
AD-70740	UUCAUGUCCACUCAUGCA	1033	981-999	UGCAUGAGUGGGACAUGAA	1217	981-999
AD-70741	ACUCAUGCCCGCGAGCCA	1034	991-1009	UGGCUGCGGGGCAUGAGU	1218	991-1009
AD-70742	CGCAGCCGGCACCGCGAA	1035	1002-1020	UUCGGCGGUGCCGGCUGCG	1219	1002-1020
AD-70743	ACCGCCGAAGCCUCAGCCA	1036	1012-1030	UGGCUAGGCUUCGGCGGU	1220	1012-1030
AD-70744	UCAGCCACGACCCGGACA	1037	1024-1042	UGUCCGGGUCGUGGGCUGA	1221	1024-1042
AD-70745	ACCCGGACCCCGCCUCAGU	1038	1034-1052	ACUGAGCGGGGUCGGGU	1222	1034-1052
AD-70562	CCUCAGUCCAGACCCCGA	1039	1046-1064	UCGGGUCUGGGACUGAGG	1223	1046-1064
AD-70563	AGACCCCGGGAGCCUUGCA	1040	1056-1074	UGCAAGGCUCCCGGGUCU	1224	1056-1074
AD-70564	CCUUGCCGGGAAAGCGGGA	1041	1068-1086	UCCCGCUUCGCCGGAAGG	1225	1068-1086
AD-70565	AAGCGGGAGCAGCCGCUU	1042	1079-1097	AAGGCGGCUUCGCCGCUU	1226	1079-1097
AD-70566	AGCCGCCUUCUCCGACCAA	1043	1089-1107	UUGGUCAGGGAAGGCGGCU	1227	1089-1107
AD-70567	UGACCAGGAACGGCCACU	1044	1101-1119	AGUGGGCCGUUCCUGGUCA	1228	1101-1119
AD-70568	CGGCCACUGAGCUGCGGA	1045	1111-1129	UCCGACGUCAGUGGGCCG	1229	1111-1129
AD-70569	UGCGGGCAGCGGCUCCGCA	1046	1124-1142	UGCGGAGCCGCUGCCGCA	1230	1124-1142
AD-70570	CGGCCUCCGAAGAGUCUGU	1047	1133-1151	ACAGACUCUUGCGGAGCCG	1231	1133-1151
AD-70571	AGUCUGUCUUCGAGACCA	1048	1145-1163	UGGUCAUCGAAGACAGACU	1232	1145-1163
AD-70572	CGAUGACCCGCGUCGUUGA	1049	1155-1173	UCAACGACGGGUCUUCG	1233	1155-1173

## 045013

AD-70573	UCGUUGCGGGGUGGUGGA	1050	1167-1185	UCCACCAGCCCACAACGA	1234	1167-1185
AD-70574	UGGUGGCGCUACGCGGGGA	1051	1179-1197	UCCCCGCGUAGCGCCACCA	1235	1179-1197
AD-70575	UACGCGGGGGCACCUCUA	1052	1188-1206	UAGGGGUGCGCCCCGCGUA	1236	1188-1206
AD-70576	ACCCCUACAUCGCCGCGCU	1053	1200-1218	AGCGCGGGCAUGUAGGGGU	1237	1200-1218
AD-70577	GCCGCGGCUACUGGGGCA	1054	1211-1229	UGCCCCAGUACAGCGCGGC	1238	1211-1229
AD-70578	CUGGGGCCACAGUUUCUGA	1055	1222-1240	UCAGAAACUGUGGGCCAG	1239	1222-1240
AD-70579	UUUCUGCGCCGGCAGCCUA	1056	1234-1252	UAGGCGCGGGCAGAAA	1240	1234-1252
AD-70580	CGGCAGCCUCAUCGCCCA	1057	1243-1261	UGGGCGAUGAGGCGCCG	1241	1243-1261
AD-70581	UCGCCCCUGCGGGUGCU	1058	1254-1272	AGCACCCAGCAGGGGGCGA	1242	1254-1272
AD-70582	UGGGUGCUGACGGCCGCUA	1059	1265-1283	UAGCGCCGUCAGCACCCA	1243	1265-1283
AD-70583	GCCGUCACUCGCCUGCAGA	1060	1277-1295	UCUGCAGGCGAGCGGGC	1244	1277-1295
AD-70584	CUGCAGGACCGCCCGCAA	1061	1289-1307	UUGCGGGCCGGUCCUGCAG	1245	1289-1307
AD-70585	GGCCCGCACCGAGGAUCU	1062	1299-1317	AGAUCUCUGGGUGCGGGCC	1246	1299-1317
AD-70586	CGAGGAUCUGACGGUGGUA	1063	1309-1327	UACCACCGUCAGAUCCUCG	1247	1309-1327
AD-70587	GUGGUGCUGGCCAGGAAA	1064	1322-1340	UUUCCUGGCGGAGCACAC	1248	1322-1340
AD-70588	GCCAGGAACGCCGUAACCA	1065	1332-1350	UGGUUACGGCGUCCUGGC	1249	1332-1350
AD-70589	CGUAACCACAGCUGUGAGA	1066	1343-1361	UCUCACAGCUGUGGUUACG	1250	1343-1361
AD-70590	UGUGAGCCGUGCCAGACGU	1067	1355-1373	ACGUCUGGCACGGCUCACA	1251	1355-1373
AD-70591	UGCCAGACGUGGGCGUGA	1068	1364-1382	UCACGGCCACGUCUGGCA	1252	1364-1382
AD-70592	GCCGUGCGCUCUACCGCU	1069	1376-1394	AGCGGUAAGGAGCGCACGGC	1253	1376-1394
AD-70593	UACCGCUUGCACGAGGCCU	1070	1388-1406	AGGCCUCGUGCAAGCGGUA	1254	1388-1406
AD-70594	ACGAGGCCUUCUGCCCGU	1071	1398-1416	ACGGGCGAGAAGGCCUCGU	1255	1398-1416
AD-70595	UCGCCCCGUCAGUACCAGA	1072	1409-1427	UCUGGUAAGCUGACGGGCGA	1256	1409-1427
AD-70596	CUACCAGCACACCGGCU	1073	1420-1438	AGCCAGGUCGUGCGGUAG	1257	1420-1438
AD-70597	ACCUGGCUUCUGCGCCU	1074	1431-1449	AGGCGCAACAGAGCCAGGU	1258	1431-1449
AD-70598	UUGCGCCUUCAGGAGGAUA	1075	1442-1460	UAUCCUCCUGAAGGCGCAA	1259	1442-1460
AD-70599	GAGGAUGCGGACGGCAGCU	1076	1454-1472	AGCUGCGGUCGCAUCCUC	1260	1454-1472
AD-70600	ACGGAGCUGCGCGCUCU	1077	1464-1482	AGGAGCGGCGAGCUGCCGU	1261	1464-1482
AD-70601	CGCUCUCUGCCUUCGCU	1078	1476-1494	ACGUAAGGCGACAGGAGCG	1262	1476-1494
AD-70602	CCUUCAGUUCAGCCGGUGU	1079	1487-1505	ACACCGGCGAAGCUAAGG	1263	1487-1505
AD-70603	AGCCGGUGUGCCUGCCAAA	1080	1497-1515	UUUGGAGGCAACCGGCU	1264	1497-1515
AD-70604	UGCCAAAGCGGCGCCGCA	1081	1509-1527	UGCGGGGCGCCGUGGCA	1265	1509-1527
AD-70605	GCGCGCGGACCCUCCGA	1082	1518-1536	UCGGAGGGUCGCGCGCCG	1266	1518-1536
AD-70606	CCUCCGAGCACGCGUCU	1083	1529-1547	AGAGCGGUGUCUCGAGGG	1267	1529-1547
AD-70607	CGCUCUGCCAGGUGGCCGA	1084	1542-1560	UCGGCCACCUGGCGAGGCG	1268	1542-1560
AD-70608	AGGUGCCCGGUGGGCCA	1085	1551-1569	UGCCCCAGCCGGCCACCU	1269	1551-1569
AD-70609	UGGGGCCACAGUUCGAGA	1086	1562-1580	UCUCGAACUGGUGGCCCA	1270	1562-1580
AD-70610	UUCGAGGGGGCGGAGAAU	1087	1574-1592	AUUCUCCGCCCCUCGAA	1271	1574-1592
AD-70611	CGGAGGAUAUAGCCAGCUU	1088	1584-1602	AAGCUGGCAUAUCCUCCG	1272	1584-1602
AD-70612	CAGCUUCUGCAGGAGGCA	1089	1597-1615	UGCCUCCUGCAGGAAGCUG	1273	1597-1615
AD-70613	AGGAGGCGCAGGUACCGUU	1090	1608-1626	AACGGUACCUGCGCCUCU	1274	1608-1626
AD-70614	AGGUACCGUUCUCUCCU	1091	1617-1635	AGGGAGGGAACGGUACCU	1275	1617-1635
AD-70615	CUCUCCUGGAGCGUGCU	1092	1628-1646	AGCAGCGUCCAGGGAGAG	1276	1628-1646
AD-70616	CGCUGCUCAGCCCCGACA	1093	1640-1658	UGUCCGGGCGAGGAGCG	1277	1640-1658
AD-70617	CCGGACGUGCACGGAUCCU	1094	1652-1670	AGGAUCCGUGCACGUCCG	1278	1652-1670
AD-70618	CGGAUCCUCCAUCCUCCA	1095	1663-1681	UGGGAGGAUGGAGGAUCCG	1279	1663-1681
AD-70619	CAUCCUCCCCGGCAUGCUA	1096	1672-1690	UAGCAUCCGGGAGGAUG	1280	1672-1690
AD-70620	CAUGCUCUGCGCAGGGUUA	1097	1684-1702	UAACCUCCGCGAGGCAUG	1281	1684-1702
AD-70621	AGGGUUCUCGAGGGGGA	1098	1696-1714	UCCGCCUCGAGGAACCU	1282	1696-1714
AD-70622	GAGGGCGGACCGAUGCGU	1099	1706-1724	ACGCAUCGGUGCCGCCUC	1283	1706-1724
AD-70623	GAUCGUGCCAGGUGAUU	1100	1718-1736	AAUACCCUCCGACGCAUC	1284	1718-1736
AD-70624	AGGGUUAUCCGGAGGCCA	1101	1728-1746	UGGCCUCCGAAUACCCU	1285	1728-1746
AD-70625	CGGAGGCCCGUGGUGUGU	1102	1738-1756	ACACACCAGCGGCCUCCG	1286	1738-1756
AD-70626	GGUGUGUAGGACCAAGCU	1103	1750-1768	AGCUUGGUCCACACACC	1287	1750-1768

AD-70627	CCAAGCUGCAGAGCGCCGA	1104	1762-1780	UCGGCGCUCGAGCUUGG	1288	1762-1780
AD-70628	AGAGCGCCGGCUCACCCUA	1105	1771-1789	UAGGGUGAGCCGGCGCUCU	1289	1771-1789
AD-70629	UCACCCUGCAAGGCAUCAU	1106	1782-1800	AUGAUGCCUUGCAGGGUGA	1290	1782-1800
AD-70630	GGCAUCAUCAGCUGGGGAU	1107	1793-1811	AUCCCAGCUGAUGAUGCC	1291	1793-1811
AD-70631	CUGGGGAUCGGGCUUGGU	1108	1804-1822	ACCACAGCCCGAUCGCCAG	1292	1804-1822
AD-70632	UGUGUGACCCGCAACAAGA	1109	1817-1835	UCUUGUUGCGGUCACCACA	1293	1817-1835
AD-70633	CAACAAGCCAGGCGCUAA	1110	1828-1846	UUAGACGCGGCUUGUUG	1294	1828-1846
AD-70634	AGGCGUCUACACCGAUGUA	1111	1837-1855	UACAUCGGUGUAGACGCCU	1295	1837-1855
AD-70635	GAUGUGCCUACUACCGUA	1112	1850-1868	UCAGGUAGUAGGCCACAUC	1296	1850-1868
AD-70636	UACUACCGGCGGGAUCA	1113	1859-1877	UGAUCCAGGCCAGGUAGUA	1297	1859-1877
AD-70637	CUGGAUCCGGGAGCACACA	1114	1870-1888	UGUGUGCUCGCGAUCAG	1298	1870-1888
AD-70638	AGCACACCGUUUCUGAUU	1115	1881-1899	AAUCAGGAAACGGUGUCU	1299	1881-1899
AD-70639	UCCUGAUUGCUCAGGGACU	1116	1892-1910	AGUCCUGAGCAUCCAGGA	1300	1892-1910
AD-70640	CAGGGACUCAUUCUCCCU	1117	1903-1921	AGGGAAAGAUAGUCCUG	1301	1903-1921
AD-70641	UUUCCCUCCUUGGUAUUA	1118	1915-1933	UAAUACCAAGGAGGGAAA	1302	1915-1933
AD-70642	UGGUAUUCGCGAGUGAGA	1119	1925-1943	UCUCACUGCGGAUACCCA	1303	1925-1943
AD-70643	AGUGAGAGUGGCGUGGA	1120	1937-1955	UCCCAGCCACUCUCACU	1304	1937-1955
AD-70644	GCUGGGGCAUGGAAGCAA	1121	1949-1967	UUGCCUUCGAGCCCGCAGC	1305	1949-1967
AD-70645	UGGAAGGCAAGAUUGUGUA	1122	1958-1976	UACACAAUCUUGCCUCCA	1306	1958-1976
AD-70646	UUGUGUCCCAUCCCCCAA	1123	1970-1988	UUGGGGAAUGGGACACAA	1307	1970-1988
AD-70647	UCCCCAGUGCGGCCAGCU	1124	1981-1999	AGCUGGCCGCACUGGGGA	1308	1981-1999
AD-70648	GCCAGCUCGCGCCAGGAU	1125	1993-2011	AUCCUGGCGGAGCUGGC	1309	1993-2011
AD-70649	GCCAGGAUGGCGCAGGAAA	1126	2004-2022	UUUCCUGCGCAUCCUGGC	1310	2004-2022
AD-70650	GCAGGAACUCAUAAAAGUA	1127	2015-2033	UACUUUAUUGAUUCCUGC	1311	2015-2033
AD-70651	AAUAAAGUGCUUUGAAAAU	1128	2025-2043	AUUUUCAAAGCACUUUAUU	1312	2025-2043
AD-70652	UUGAAAAGCUGAGAAAAA	1129	2036-2054	UUUUUCUCAGCAUUUCAA	1313	2036-2054

Таблица 21. Модифицированные последовательности F12

Название дуплекса	Смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-70653	GACUCCUGGAUAGGCAGCUdTdT	1314	AGCUGCCUUAUCCAGGAGUCdTdT	1498	GACUCCUGGAUAGGCAGCU	1682
AD-70654	UAGGCAGCUGGACCAACGAdTdT	1315	UCGUUGUCCAGCUGCCUAdTdT	1499	UAGGCAGCUGGACCAACCG	1683
AD-70655	ACCAACGGACGGAUGCCAUdTdT	1316	AUGGCAUCCGUCGUGGUdTdT	1500	ACCAACGGACGGAUGCCAU	1684
AD-70656	AUGCCAUAGGGGCUUGCUdTdT	1317	AGCAGAGCCCUCAUGGCAUdTdT	1501	AUGCCAUAGGGGCUUGCU	1685
AD-70657	GCUCUGCUGCUCUGGGUdTdT	1318	ACCCAGGAGCAGCAGAdTdT	1502	GCUCUGCUGCUCUGGGU	1686
AD-70658	UCCUGGGUUCUGCUGGUdTdT	1319	ACCAGCAGGAACCCAGAdTdT	1503	UCCUGGGUUCUGCUGGU	1687
AD-70659	CUGCUGGAGCUGGAGUdTdT	1320	ACUCCAAGCUCACCAGCAdTdT	1504	CUGCUGGAGCUGGAGU	1688
AD-70660	CUUGGAGUCAACAUUUCAdTdT	1321	UGAAAGUUGACUCCAAGdTdT	1505	CUUGGAGUCAACAUUUCG	1689
AD-70661	ACUUUCGAUUCACCUUGAdTdT	1322	UCAAGGUGAAUCGAAAGUdTdT	1506	ACUUUCGAUUCACCUUGG	1690
AD-70662	CCACCUUGGGAAGCCCAAdTdT	1323	UGGGGCUUCCCAAGGUGdTdT	1507	CCACCUUGGGAAGCCCA	1691
AD-70663	GCCCCAAGGAGCAUAGUdTdT	1324	ACUUUAGCUCUUGGGGAdTdT	1508	GCCCCAAGGAGCAUAGU	1692
AD-70664	CAUAAGUACAAGCUGAAAdTdT	1325	UUUCAGCUUUGUACUUAUdTdT	1509	CAUAAGUACAAGCUGAAG	1693
AD-70665	AAGCUGAAGAGCACACAGUdTdT	1326	ACUGUGGUCUUCAGCUUdTdT	1510	AAGCUGAAGAGCACACAGU	1694
AD-70666	ACACAGUCGUUCACACUGUdTdT	1327	ACAGUGAGAACGACUGUdTdT	1511	ACACAGUCGUUCACACUGU	1695
AD-70667	UUUCACACUCACCCGGAdTdT	1328	UCCCGGUGACAGUGAGAAdTdT	1512	UUUCACACUCACCCGGGA	1696
AD-70668	ACCGGGAGCCUGCCACUdTdT	1329	AGUGGCAGGGCUCCCGGUdTdT	1513	ACCGGGAGCCUGCCACU	1697
AD-70669	UGCCACUUCUCCUUCAGUdTdT	1330	ACUGGAAGGGGAUGGCAAdTdT	1514	UGCCACUUCUCCUUCAGU	1698
AD-70670	UUCAGUACCACCGCAGAdTdT	1331	UCUGCCGGUGUACUGGAAdTdT	1515	UUCAGUACCACCGCAGC	1699
AD-70671	ACCGGCAGCUGUACCACAAdTdT	1332	UUGUGUACAGCUGCCGUdTdT	1516	ACCGGCAGCUGUACCACAA	1700
AD-70672	UACCACAAUUGUACCCAdTdT	1333	UGUGGUACAUUUGGUAdTdT	1517	UACCACAAUUGUACCCACA	1701
AD-70673	UACCACAAGGGCCGCCAdTdT	1334	UGGCCGCCUUGUGGUAdTdT	1518	UACCACAAGGGCCGCCA	1702
AD-70674	GCCGCCAGGCCUCAGCAdTdT	1335	UGCUGAGGGCCUGCCGAdTdT	1519	GCCGCCAGGCCUCAGCC	1703
AD-70675	CUCAGCCUGGUGCUAAdTdT	1336	UUAGCACACCAGGCGAGdTdT	1520	CUCAGCCUGGUGCUAC	1704

045013

AD-70676	UGUGCUACCACCCCAACUdTdT	1337	AGUUGGGGUGGUAGCACAdTdT	1521	UGUGCUACCACCCCAACU	1705
AD-70677	ACCCCAACUUUGAUCAGAdTdT	1338	UCUGAUCAAAGUUGGGGUdTdT	1522	ACCCCAACUUUGAUCAGG	1706
AD-70678	AUCAGGACCAGCGAUGGGAdTdT	1339	UCCCAUCGCGUGGCCUGAdTdT	1523	AUCAGGACCAGCGAUGGGG	1707
AD-70679	AGCGAUGGGGAUACUGUUdTdT	1340	AAACAGUAUCCCAUCGCUdTdT	1524	AGCGAUGGGGAUACUGUUU	1708
AD-70680	UACUGUUUGAGCCCAAGAdTdT	1341	UCUUGGGCUCCAAACAGUAdTdT	1525	UACUGUUUGAGCCCAAGA	1709
AD-70681	CCAAGAAAGUGAAAGACCAdTdT	1342	UGGCUUUUCACUUUCUUGGdTdT	1526	CCAAGAAAGUGAAAGACCA	1710
AD-70682	AAAGACCACUGCAGCAACAdTdT	1343	GUUUGCUGCAGUGGCUUUdTdT	1527	AAAGACCACUGCAGCAAAC	1711
AD-70683	UGCAGCAAAACAGCCCUdTdT	1344	AGGGGCGUGUUUGCUGAdTdT	1528	UGCAGCAAAACAGCCCUU	1712
AD-70684	AGCCCUUGCCAGAAAGGAAdTdT	1345	UUCCUUUCUGGCAGGGGCUdTdT	1529	AGCCCUUGCCAGAAAGGAG	1713
AD-70685	AGAAAGGAGGGACCUGUGdTdT	1346	ACACAGGUCUCCUUUCUdTdT	1530	AGAAAGGAGGGACCUGUGU	1714
AD-70686	ACCUUGUGAACAUGCCAdTdT	1347	UUGGAUGUUCACACAGUdTdT	1531	ACCUUGUGAACAUGCCAA	1715
AD-70687	AUGCCAAGCGGCCCCACUdTdT	1348	AGUGGGGCGCUGGCAUdTdT	1532	AUGCCAAGCGGCCCCACU	1716
AD-70688	GCCCCACUGUCUCUGCAdTdT	1349	UGCAGAGACAGUGGGGCUdTdT	1533	GCCCCACUGUCUCUGUCC	1717
AD-70689	CACCUCACUGGAAACCACUdTdT	1350	AGUGGUUUCCAGUGAGGUGdTdT	1534	CACCUCACUGGAAACCACU	1718
AD-70690	AACCACUGCCAGAAAGAGAdTdT	1351	UCUCUUUCUGGCAGUGGUdTdT	1535	AACCACUGCCAGAAAGAGA	1719
AD-70691	CAGAAAGAGAAGUGCUUAdTdT	1352	UAAAGCACUUUCUUUCUGdTdT	1536	CAGAAAGAGAAGUGCUUUG	1720
AD-70692	UGC UUUGAGCCUAGCUUAdTdT	1353	UAAGCUGAGGCUAAAGCAdTdT	1537	UGC UUUGAGCCUAGCUUC	1721
AD-70693	CAGCUUCUCCGGUUUUUAdTdT	1354	UGAAAACCCGAGAAAGCUdTdT	1538	CAGCUUCUCCGGUUUUUCC	1722
AD-70694	CGGUUUUUCACAGAUAUAdTdT	1355	UAUUUCUUGGGAAAACCGdTdT	1539	CGGUUUUUCACAGAUAUG	1723
AD-70695	CAAGAAUGAGAUUAGGUAdTdT	1356	AUACCAUAUCUAUUUCUGdTdT	1540	CAAGAAUGAGAUUAGGUAU	1724
AD-70696	UAUGGUUAUAGAACUGAGCAdTdT	1357	UGCUCAGUUCUAUACCAUAdTdT	1541	UAUGGUUAUAGAACUGAGCA	1725
AD-70697	UGAGCAAGCAGCUGGGCAdTdT	1358	UGCCACAGCUGCUUGCAdTdT	1542	UGAGCAAGCAGCUGGGCC	1726
AD-70698	GCUGUGGCCAGAUGCCAGUdTdT	1359	ACUGGCAUCUGGCCACAGCdTdT	1543	GCUGUGGCCAGAUGCCAGU	1727
AD-70699	AUGCCAGUGCAAGGGUCCUdTdT	1360	AGGACCCUUGCAGUGGCUdTdT	1544	AUGCCAGUGCAAGGGUCCU	1728
AD-70700	AAGGGUCCUGAUGCCACUdTdT	1361	AGUGGGCAUCAGGACCCUdTdT	1545	AAGGGUCCUGAUGCCACU	1729
AD-70701	UGCCACUGCCAGCGGCUAdTdT	1362	UAGCCGUGGCAUGGGCAdTdT	1546	UGCCACUGCCAGCGGCUG	1730
AD-70702	CGGCUUGGCCAGCCAGCCUdTdT	1363	AGGCCUGGCGGCCAGCCGdTdT	1547	CGGCUUGGCCAGCCAGCCU	1731
AD-70703	AGCCAGGCCUGCCGACCAAdTdT	1364	UGGUGCGGCAGGCCUGGCUdTdT	1548	AGCCAGGCCUGCCGACCA	1732
AD-70704	CGCACCAACCCGUGCCUAdTdT	1365	UGAGGCACGGGUUGGUGCdTdT	1549	CGCACCAACCCGUGCCUCC	1733
AD-70705	UGCCUCCAUGGGGGUCGCUdTdT	1366	AGCCACCCCAUGGAGGCAdTdT	1550	UGCCUCCAUGGGGGUCGCU	1734
AD-70706	GGGUCGCGUCCUAGAGGUdTdT	1367	ACCUCUAGGCAGCGACCCAdTdT	1551	GGGUCGCGUCCUAGAGGU	1735
AD-70707	CUAGAGGUGGAGGGCCACAdTdT	1368	UGUGGCCUCCACCCUAGdTdT	1552	CUAGAGGUGGAGGGCCACC	1736
AD-70708	AGGGCCACCCGCUUGCCAdTdT	1369	UGGCACAGCGGUGGCCUdTdT	1553	AGGGCCACCCGCUUGCCCA	1737
AD-70709	UGUGCCACUGCCCGUGGAdTdT	1370	UCCACGGGCGAGUGGCAdTdT	1554	UGUGCCACUGCCCGUGGG	1738
AD-70710	CGGUGGGCUACACCGGAGAdTdT	1371	UCUCGGGUGUAGCCACCGdTdT	1555	CGGUGGGCUACACCGGAGC	1739
AD-70711	ACCGAGCCUUCUGGACAdTdT	1372	UGUCGCAAGGCUCCGUGdTdT	1556	ACCGAGCCUUCUGGACG	1740
AD-70712	UUCUGCAGCUGGACACAdTdT	1373	UGGUGCCACGUCGAGAAdTdT	1557	UUCUGCAGCUGGACACCA	1741
AD-70713	GACACCAAGGCAAGCUGCUdTdT	1374	AGCAGCUGCCUUGGUGCUdTdT	1558	GACACCAAGGCAAGCUGCU	1742
AD-70714	CAAGCUGCUAUGAUGGCCAdTdT	1375	UGGCCAUCAUAGCAGCUUdTdT	1559	CAAGCUGCUAUGAUGGCCG	1743
AD-70715	GAUGGCCGCGGGCUCAGCUdTdT	1376	AGCUGAGCCCGGGCAUCdTdT	1560	GAUGGCCGCGGGCUCAGCU	1744
AD-70716	UCAGCUACCGCGGCUUGGAdTdT	1377	UCCAGGCGCGGUAGCUGAdTdT	1561	UCAGCUACCGCGGCUUGGC	1745
AD-70717	CGGCCUGGCCAGGACCACAdTdT	1378	UGUGGUCCUGGCCAGGCCGdTdT	1562	CGGCCUGGCCAGGACCACG	1746
AD-70718	AGGACCACGCUUCGCGUAdTdT	1379	UACCCGAGAGCGUGGUCCUdTdT	1563	AGGACCACGCUUCGCGGUG	1747
AD-70719	UCGGGUGCGCCUUGCAGAdTdT	1380	UCUGACAGGGCGACCCGAdTdT	1564	UCGGGUGCGCCUUGCAGC	1748
AD-70720	CUGUCAGCCUGGGCCUAdTdT	1381	UGAGGCCACGGCUGACAGdTdT	1565	CUGUCAGCCUGGGCCUCG	1749
AD-70721	UGGGCCUCGAGGCCACCUdTdT	1382	AGGUGGCCUCCGAGGCCAdTdT	1566	UGGGCCUCGAGGCCACCU	1750
AD-70722	CCACCUACCGGAACGUGAAdTdT	1383	UUCACGUUCCGGUAGGUGdTdT	1567	CCACCUACCGGAACGUGAC	1751
AD-70723	AACGUGACUGCCGAGCAAdTdT	1384	UUUGCUCGGCAGUCAGUAdTdT	1568	AACGUGACUGCCGAGCAAG	1752
AD-70724	CGAGCAAGCGCGGAACUGAdTdT	1385	UCAGUUCGCGCUUGCUCGdTdT	1569	CGAGCAAGCGCGGAACUGG	1753
AD-70725	CGGAACUGGGGACUGGGCAdTdT	1386	UGCCAGUCCCAAGUCCGdTdT	1570	CGGAACUGGGGACUGGGCG	1754
AD-70726	GACUGGGCGGCCACGCCUdTdT	1387	AAGCGUGGGCCCGACGCUdTdT	1571	GACUGGGCGGCCACGCCUU	1755
AD-70727	ACGCCUUCUGCCGGAACAdTdT	1388	UGGUUCGGCAGAAGGCUdTdT	1572	ACGCCUUCUGCCGGAACCC	1756
AD-70728	CGGAACCCGACACACAdTdT	1389	UGUCGUUUGCCGGUCCGdTdT	1573	CGGAACCCGACACACGACA	1757
AD-70729	AACGACAUCCGCCCGUGUdTdT	1390	ACCACGGGCGGAUGUCGUdTdT	1574	AACGACAUCCGCCCGUGGU	1758

## 045013

AD-70730	GCCCUGGUGCUUCGUGCUdTdT	1391	AGCACGAAGCACCACGGGcdTdT	1575	GCCCUGGUGCUUCGUGCU	1759
AD-70731	UUCGUGUGAACC CGACAdTdT	1392	UGUCGCGGUUCAGCACGAAdTdT	1576	UUCGUGUGAACC CGGACCC	1760
AD-70732	ACCGCGACCCGGCUGAGCUAdTdT	1393	UAGCUCAGCCGGUCGCGGdAdTdT	1577	ACCGCGACCCGGCUGAGCUG	1761
AD-70733	CUGAGCUGGGAGUACUGCAdTdT	1394	UGCAGUACUCCAGCUCAGdTdT	1578	CUGAGCUGGGAGUACUGCG	1762
AD-70734	UACUIGCGACCUIGGCACAGUdTdT	1395	ACUIGUGCCAGGUCGCAGUAdTdT	1579	UACUIGCGACCUIGGCACAGU	1763
AD-70735	UGGCACAGUGCCAGACCCAdTdT	1396	UGGGUCUGGCACUGUGCCAdTdT	1580	UGGCACAGUGCCAGACCC	1764
AD-70736	AGACCCCAACCAGCGAdTdT	1397	UCCGCCUGGGUUGGGUCdAdTdT	1581	AGACCCCAACCAGCGGC	1765
AD-70737	AGGCGGCCUCCGACCCAdTdT	1398	UGGGUCGAGGCGCCGCUdTdT	1582	AGGCGGCCUCCGACCC	1766
AD-70738	UCCGACCCCGGUGUCCCUdTdT	1399	AGGGGACACCGGGUCGAdTdT	1583	UCCGACCCCGGUGUCCCU	1767
AD-70739	UGUCCCUAGGCUUCAUGdTdT	1400	ACAUGAAGCCUAGGGACAdTdT	1584	UGUCCCUAGGCUUCAUGU	1768
AD-70740	UUCAUGUCCACUCAUGAdTdT	1401	UGC AUGAGUGGACAUGAdTdT	1585	UUCAUGUCCACUCAUGCC	1769
AD-70741	ACUCAUGCCCGCGACCCAdTdT	1402	UGGUCGCGGGGCAUGAdTdT	1586	ACUCAUGCCCGCGACCCG	1770
AD-70742	CGCAGCCGCGACCCGAAAdTdT	1403	UUCGGCGGUGCCGGUCGdTdT	1587	CGCAGCCGCGACCCGCGAA	1771
AD-70743	ACCGCCGAAGCCUCAGCCAdTdT	1404	UGGUCAGGCUUCGGCGUdTdT	1588	ACCGCCGAAGCCUCAGCCC	1772
AD-70744	UCAGCCACGACCCGACAdTdT	1405	UGUCCGGUCGUGGGUCAdTdT	1589	UCAGCCACGACCCGACCC	1773
AD-70745	ACCCGGACCCCGCCUCAGUdTdT	1406	ACUGAGGCGGGUCCGGGdAdTdT	1590	ACCCGGACCCCGCCUCAGU	1774
AD-70562	CCUCAGUCCAGACCCGAdTdT	1407	UCGGGGUCUGGGACUGAGdTdT	1591	CCUCAGUCCAGACCCCG	1775
AD-70563	AGACCCCGGAGCCUUGCAdTdT	1408	UCCAGGCUCCCGGGUCdAdTdT	1592	AGACCCCGGAGCCUUGCC	1776
AD-70564	CCUUGCCGGCGAAGCGGAdTdT	1409	UCCGCUUCGCGGCAAGdTdT	1593	CCUUGCCGGCGAAGCGGGA	1777
AD-70565	AAGCGGAGCAGCCGCUdTdT	1410	AAGCGCGUCUCCGCUdTdT	1594	AAGCGGAGCAGCCGCUU	1778
AD-70566	AGCCGCCUUCUCCUGACCAAdTdT	1411	UUGGUCAGGGAAGCGGCUdTdT	1595	AGCCGCCUUCUCCUGACCAG	1779
AD-70567	UGACCAGGAACGCGCCACUdTdT	1412	AGUGGGCCGUCCUGGUCAdTdT	1596	UGACCAGGAACGCGCCACU	1780
AD-70568	CGGCCACUGAGCUGCGAdTdT	1413	UCCGACGUCAGUGGGCCdTdT	1597	CGGCCACUGAGCUGCGGG	1781
AD-70569	UGCGGGCAGCGCUCGAdTdT	1414	UGCGGAGCCGUCGCCGAdTdT	1598	UGCGGGCAGCGCUCGCA	1782
AD-70570	CGGCUCCGCAAGAGUCUGdTdT	1415	ACAGACUCUUGCGGAGCCdTdT	1599	CGGCUCCGCAAGAGUCUGU	1783
AD-70571	AGUCUGUCUUCGAGACAdTdT	1416	UGGUCUUCGAGACAGAdTdT	1600	AGUCUGUCUUCGAGACCC	1784
AD-70572	CGAUGACCCGCGUCUGAdTdT	1417	UCAACGACGCGGUCUAdTdT	1601	CGAUGACCCGCGUCUUGG	1785
AD-70573	UCGUUGCGGGUCUGGAdTdT	1418	UCCACCAGCCCGCAACAdTdT	1602	UCGUUGCGGGUCUGGUC	1786
AD-70574	UGGUGGCGUACGCGGGAdTdT	1419	UCCCGCGUAGCGCCACAdTdT	1603	UGGUGGCGUACGCGGGC	1787
AD-70575	UACGCGGGCGCACCCUAdTdT	1420	UAGGGGUGCGCCCGCUAdTdT	1604	UACGCGGGCGCACCCCUA	1788
AD-70576	ACCCCUACAUCGCGCGCUdTdT	1421	AGCGCGGCAUGUAGGGdAdTdT	1605	ACCCCUACAUCGCGCGCU	1789
AD-70577	GCCGCGCUIGUACUIGGGAdTdT	1422	UGCCCAAGUACAGCGGAdTdT	1606	GCCGCGCUIGUACUIGGGC	1790
AD-70578	CUGGGCCACAGUUCUGAdTdT	1423	UAGAAACUGUGCCCGAdTdT	1607	CUGGGCCACAGUUCUCG	1791
AD-70579	UUUCUGCGCCGCGAGCCUAdTdT	1424	UAGGCUCCGCGCAGAAAdTdT	1608	UUUCUGCGCCGCGAGCCUC	1792
AD-70580	CGGCAGCCUCAUCGCCCCAdTdT	1425	UGGGCGAUGAGGCGCCdTdT	1609	CGGCAGCCUCAUCGCCCC	1793
AD-70581	UCGCCCCUCUGGGUGCUdTdT	1426	AGCACCCAGCAGGGGCGAdTdT	1610	UCGCCCCUCUGGGUGCU	1794
AD-70582	UGGGUGCUGACGGCCUAdTdT	1427	UAGCGCCGUCAGCACCCAdTdT	1611	UGGGUGCUGACGGCCGUC	1795
AD-70583	GCCGUCACUGCCUGCAGAdTdT	1428	UCUGCAGGCAUGAGCGGdAdTdT	1612	GCCGUCACUGCCUGCAGG	1796
AD-70584	CUGCAGGACCCGCGCAAdTdT	1429	UUGCGGGCCGUCUCGAdTdT	1613	CUGCAGGACCCGCGCAC	1797
AD-70585	GGCCCGACCCGAGGAUCdTdT	1430	AGAUCUCGGGUGCGGGCAdTdT	1614	GGCCCGACCCGAGGAUCU	1798
AD-70586	CGAGGAUCUGACGGUGUAdTdT	1431	UACCACCGUCAGAUCCUGdTdT	1615	CGAGGAUCUGACGGUGUG	1799
AD-70587	GUGGUGCUGGGCAGGAAAdTdT	1432	UUUCUGGGCGAGCACAdTdT	1616	GUGGUGCUGGGCAGGAAAC	1800
AD-70588	GCCAGGAACGCCGUAACAdTdT	1433	UGGUUACGGCGUUCUGGcdTdT	1617	GCCAGGAACGCCGUAACCA	1801
AD-70589	CGUAACCACAGCUGUGAGAdTdT	1434	UCUCACAGCUGUGGUUAdTdT	1618	CGUAACCACAGCUGUGAGC	1802
AD-70590	UGUGAGCCGUGCCAGCUGdTdT	1435	ACGUCUGGCACGGCUCAdTdT	1619	UGUGAGCCGUGCCAGCAGU	1803
AD-70591	UGCCAGACGUUGGCCUGAdTdT	1436	UCACGGCAACGUCUGCCAdTdT	1620	UGCCAGACGUUGGCCGUGC	1804
AD-70592	GCCGUGCGCUCUACCGCUdTdT	1437	AGCGGUAAGGAGCGCAGGAdTdT	1621	GCCGUGCGCUCUACCGCU	1805
AD-70593	UACCGCUUGCAGGAGCCUdTdT	1438	AGGCCUCGUGCAAGCGGUAdTdT	1622	UACCGCUUGCAGGAGCCUCU	1806
AD-70594	ACGAGGCCUUCUGCCCGUdTdT	1439	ACGGCGAGAGGCCUCGdAdTdT	1623	ACGAGGCCUUCUGCCCGU	1807
AD-70595	UCGCCGUCAGCUACCGAdTdT	1440	UCUGGUAGCUGACGGGAdTdT	1624	UCGCCGUCAGCUACCGAGC	1808
AD-70596	CUACCAGCACGACCGGCUdTdT	1441	AGCCAGGUCGUGGUGAdTdT	1625	CUACCAGCACGACCGGCU	1809
AD-70597	ACCUGGCUUGUUGCGCCUdTdT	1442	AGGCGCAACAGAGCCAGGdAdTdT	1626	ACCUGGCUUGUUGCGCCU	1810
AD-70598	UUGCCCUUCAGGAGGAUAdTdT	1443	UAUCCUCUGAAGCGCAAdTdT	1627	UUGCCCUUCAGGAGGAUG	1811
AD-70599	GAGGAUGCGGACGGCAGCUdTdT	1444	AGCUGCCGUCGCAUCCUdTdT	1628	GAGGAUGCGGACGGCAGCU	1812

## 045013

AD-70600	ACGGCAGCUGCGCGCUCCUdTdT	1445	AGGAGCGCGCAGCUGCCGUdTdT	1629	ACGGCAGCUGCGCGCUCCU	1813
AD-70601	CGCUCUCUGCGCCUUAACGUdTdT	1446	ACGUAAAGCGACAGGAGCGdTdT	1630	CGCUCUCUGCGCCUUAACGU	1814
AD-70602	CCUUAACGUUCAGCCGGUGUdTdT	1447	ACACCCGGCUGAACGUAAAGGdTdT	1631	CCUUAACGUUCAGCCGGUGU	1815
AD-70603	AGCCGGUGUGCCUGCCAAAdTdT	1448	UUUGGCAGGCACACCGGCUdTdT	1632	AGCCGGUGUGCCUGCCAAAG	1816
AD-70604	UGCCAAGCGCGCCGCGAdTdT	1449	UGCGCGCGCCGCUUGGCAAdTdT	1633	UGCCAAGCGCGCCGCGCG	1817
AD-70605	GCGCCGCGCGACCCUCCGAdTdT	1450	UCGGAGGGUCGCGCGCGCdTdT	1634	GCGCCGCGCGACCCUCCGA	1818
AD-70606	CCCUCGAGACCACGCUCdTdT	1451	AGAGCGUGGUCUCGAGGGdTdT	1635	CCCUCGAGACCACGCUCU	1819
AD-70607	CGCUCUGCCAGGUGGCCAdTdT	1452	UCGCCACCUGGCAGAGCdTdT	1636	CGCUCUGCCAGGUGGCCGG	1820
AD-70608	AGGUGGCCGCGUGGGCCAdTdT	1453	UGGCCACCGCCGCCACCUdTdT	1637	AGGUGGCCGCGUGGGCCA	1821
AD-70609	UGGGCCACCAGUUCGAGAdTdT	1454	UCUCGAACUGGUGGCCCAAdTdT	1638	UGGGCCACCAGUUCGAGG	1822
AD-70610	UUCGAGGGGGCGGAGAAUdTdT	1455	AUUCUCGCCCCUCGAAAdTdT	1639	UUCGAGGGGGCGGAGAAU	1823
AD-70611	CGGAGAAUUAUGCCAGCUdTdT	1456	AAGCUGCAUAUUCUCCGdTdT	1640	CGGAGAAUUAUGCCAGCUU	1824
AD-70612	CAGCUUCUCGAGGAGGCAdTdT	1457	UGCCUCUGCAGGAGCUGdTdT	1641	CAGCUUCUCGAGGAGGCG	1825
AD-70613	AGGAGGCGCAGUACCGUdTdT	1458	AACGGUACUCGCGCCUCCUdTdT	1642	AGGAGGCGCAGUACCGUU	1826
AD-70614	AGGUACCGUUCUCUCCUdTdT	1459	AGGGAGAGGAACGGUACCUdTdT	1643	AGGUACCGUUCUCUCCCU	1827
AD-70615	CUCUCCUGGAGCGCUCUdTdT	1460	AGCAGCGCUCAGGGAGAGdTdT	1644	CUCUCCUGGAGCGCUCU	1828
AD-70616	CGCUCUCAGCCCGGACAdTdT	1461	UGUCGGGGCUGAGCAGCGdTdT	1645	CGCUCUCAGCCCGGACG	1829
AD-70617	CCGGACGUCACGGAUCCUdTdT	1462	AGGAUCCGUCACGUCGGdTdT	1646	CCGGACGUCACGGAUCCU	1830
AD-70618	CGGAUCCUACUCCUCCAdTdT	1463	UGGAGGAUUGGAGAUCCGdTdT	1647	CGGAUCCUACUCCUCCCC	1831
AD-70619	CAUCCUCCCGGCAUGCUAdTdT	1464	UAGCAUCCGGGGAGGAUGdTdT	1648	CAUCCUCCCGGCAUGCUC	1832
AD-70620	CAUGCUCUGCGCAGGGUAdTdT	1465	UAACCCUGCGCAGGAUGdTdT	1649	CAUGCUCUGCGCAGGGUUC	1833
AD-70621	AGGGUUCUCGAGGGCGAdTdT	1466	UCCGCCUCGAGGAACCUdTdT	1650	AGGGUUCUCGAGGGCGGC	1834
AD-70622	GAGGGCGCACCGAUGCGUdTdT	1467	ACGCAUCGGUGCCGCCUCdTdT	1651	GAGGGCGCACCGAUGCGU	1835
AD-70623	GAUGCGGCCAGGGUAUdTdT	1468	AAUCACCCUGGCACGCAUCdTdT	1652	GAUGCGGCCAGGGUAU	1836
AD-70624	AGGGUGAUUCCGAGGCCAdTdT	1469	UGGCCUCCGAAUACCCUdTdT	1653	AGGGUGAUUCCGAGGCC	1837
AD-70625	CGGAGGCCCGUGGUGUdTdT	1470	ACACACCAGCGGCCUCCGdTdT	1654	CGGAGGCCCGUGGUGU	1838
AD-70626	GGUGUGUGAGGACCAAGCUdTdT	1471	AGCUUGGUCUCACACCCdTdT	1655	GGUGUGUGAGGACCAAGCU	1839
AD-70627	CCAAGCUGCAGAGCGCCGAdTdT	1472	UCGGCGCUCUGCAGCUUGdTdT	1656	CCAAGCUGCAGAGCGCCGG	1840
AD-70628	AGAGCGCCGGCUCACCCUAdTdT	1473	UAGGGUGAGCCGGCGCUCdTdT	1657	AGAGCGCCGGCUCACCCUG	1841
AD-70629	UCACCCUGCAAGGCAUCAUdTdT	1474	AUGAUGCCUUGCAGGGUAdTdT	1658	UCACCCUGCAAGGCAUCAU	1842
AD-70630	GGCAUCAUCAGCUGGGGAUdTdT	1475	AUCCCCAGCUGAUGAUGCCdTdT	1659	GGCAUCAUCAGCUGGGGAU	1843
AD-70631	CUGGGGAUCGGGUGUGGUdTdT	1476	ACCACAGCCGCAUCCCAAdTdT	1660	CUGGGGAUCGGGUGUGGU	1844
AD-70632	UGUGGUGACCGCAACAAGAdTdT	1477	UCUUGUUGCGGUCACCACAdTdT	1661	UGUGGUGACCGCAACAAGC	1845
AD-70633	CAACAAGCCAGGGUCUAAdTdT	1478	UUAGACGCCUGGCUUGUdTdT	1662	CAACAAGCCAGGGUCUAC	1846
AD-70634	AGGGGUCUACACCGAUGUAdTdT	1479	UACAUCGGGUAAGACGCCUdTdT	1663	AGGGGUCUACACCGAUGUG	1847
AD-70635	GAUGUGGCCUACUACCGAdTdT	1480	UCAGGUAGUAGGCCACAUCdTdT	1664	GAUGUGGCCUACUACCGUG	1848
AD-70636	UACUACCGGCCUGGAUCAdTdT	1481	UGAUCCAGGCCAGGUAGUAdTdT	1665	UACUACCGGCCUGGAUCC	1849
AD-70637	CUGGAUCCGGGAGCACAdTdT	1482	UGUGUCUCCCGAUCCAGdTdT	1666	CUGGAUCCGGGAGCACACC	1850
AD-70638	AGCACACCGUUUCUGAUdTdT	1483	AAUCAGAAACGGUGUCUdTdT	1667	AGCACACCGUUUCUGAUU	1851
AD-70639	UCCUGAUUGCUCAGGGACUdTdT	1484	AGUCCUGAGCAUAUCAGAdTdT	1668	UCCUGAUUGCUCAGGGACU	1852
AD-70640	CAGGGACUCAUCUUCCUdTdT	1485	AGGGAAAGAUAGUCCUGdTdT	1669	CAGGGACUCAUCUUCCCU	1853
AD-70641	UUUCCUCCUUGGUGAUAdTdT	1486	UAAUCACCAAGGAGGAAAdTdT	1670	UUUCCUCCUUGGUGAUUC	1854
AD-70642	UGGUGAUUCCGACAGUAdTdT	1487	UCUCACUGCGGAUACCAAdTdT	1671	UGGUGAUUCCGACAGUGA	1855
AD-70643	AGUGAGAGAGUGGUGGGAdTdT	1488	UCCAGCCACUCUCACUdTdT	1672	AGUGAGAGAGUGGUGGGG	1856
AD-70644	GCUGGGCAUGGAAGGCAAdTdT	1489	UUGCCUCCAUGCCACAdTdT	1673	GCUGGGCAUGGAAGGCAA	1857
AD-70645	UGGAAGGCAAGAUUGUAdTdT	1490	UACACAUCUUGCCUCCAdTdT	1674	UGGAAGGCAAGAUUGUGUC	1858
AD-70646	UUUGUCCAUUCCCCAAdTdT	1491	UUGGGGAAUGGGACACAAdTdT	1675	UUUGUCCAUUCCCCAG	1859
AD-70647	UCCCCAGUGCGGCCAGCUdTdT	1492	AGCUGGCCGACUGGGGAdTdT	1676	UCCCCAGUGCGGCCAGCU	1860
AD-70648	GCCAGCUCGCGCCAGGAUdTdT	1493	AUCCUGCGCGGAGCUGCdTdT	1677	GCCAGCUCGCGCCAGGAU	1861
AD-70649	GCCAGGAUGCGCAGGAAAdTdT	1494	UUUCCUGCGCAUCCUGCdTdT	1678	GCCAGGAUGCGCAGGAAAC	1862
AD-70650	GCAGGAACUCAUAAAGUAdTdT	1495	UACUUUAUUGAUUCCUGCdTdT	1679	GCAGGAACUCAUAAAGUG	1863
AD-70651	AAUAAAGUCUUUGAAAAdTdT	1496	AUUUUCAAAGCACUUUAUdTdT	1680	AAUAAAGUCUUUGAAAUA	1864
AD-70652	UUGAAAAGUCUGAGAAAAdTdT	1497	UUUUUCACAGAUUUUCAAdTdT	1681	UUGAAAAGUCUGAGAAAA	1865

Таблица 22. Скрининг в отношении однократной дозы для F12 в клетках Нер3b

Название дуплекса	СРЕДН.	СТАНД. ОТКЛОН.
AD-70653	75,05	21,99
AD-70654	59,86	17,07
AD-70655	49,58	5,13
AD-70656	42,85	9,76
AD-70657	40,2	6,21
AD-70658	52,43	13,02
AD-70659	34,67	3,33
AD-70660	33,59	8,28
AD-70661	53,13	11,32
AD-70662	61,89	7,76
AD-70663	48,43	6,92
AD-70664	34,42	4,01
AD-70665	33,22	4,21
AD-70666	33,44	5,89
AD-70667	47,6	10,96
AD-70668	125,01	38,32
AD-70669	64,78	12,71
AD-70670	57,49	5,4
AD-70671	30,06	7,8
AD-70672	54,95	2,39
AD-70673	79,79	10,29
AD-70674	88,3	12,07
AD-70675	55,83	14,88
AD-70676	61,99	12,96
AD-70677	50,27	9,84
AD-70678	65,84	10,37
AD-70679	51,1	8,97
AD-70680	64,71	10,54
AD-70681	41,02	6,75
AD-70682	60,65	9,01
AD-70683	96,74	6,29
AD-70684	71,16	13,22

**045013**

AD-70685	99,97	12,48
AD-70686	45,51	6,21
AD-70687	68,37	5,36
AD-70688	65,68	6,4
AD-70689	63,41	5,72
AD-70690	54,1	7,23
AD-70691	43,79	11,91
AD-70692	51,36	8,64
AD-70693	43,25	7,81
AD-70694	51,13	4,52
AD-70695	47,38	4,76
AD-70696	63,08	3,96
AD-70697	49,53	6,44
AD-70698	56,12	8,22
AD-70699	53,68	4,62
AD-70700	68,45	12,64
AD-70701	94,45	11,32
AD-70702	70,82	8,36
AD-70703	93,79	7,87
AD-70704	35,84	4,09
AD-70705	87,79	5,74
AD-70706	59,21	9,08
AD-70707	64,22	10,1
AD-70708	49,55	3
AD-70709	87,37	7,17
AD-70710	76,54	11,55
AD-70711	62,4	4,69
AD-70712	80,45	8,12
AD-70713	76,68	16,28
AD-70714	61,92	15,07
AD-70715	85,76	8,24
AD-70716	97,67	8,1
AD-70717	70,83	2,72
AD-70718	50,19	9,69

045013

AD-70719	77,23	4,82
AD-70720	69,02	6,52
AD-70721	84,91	12,03
AD-70722	42,64	6,44
AD-70723	56,77	6,73
AD-70724	50,28	7,37
AD-70725	73,06	14,77
AD-70726	69,29	8,43
AD-70727	68,98	5,88
AD-70728	59,51	5,26
AD-70729	77,31	11,18
AD-70730	48,22	9,04
AD-70731	63,52	3,78
AD-70732	60,89	6,26
AD-70733	55,56	13,83
AD-70734	110,37	7,09
AD-70735	70,96	1,41
AD-70736	72,71	4,28
AD-70737	66,94	4,75
AD-70738	104,61	9,8
AD-70739	87,48	8,44
AD-70740	69,08	9,31
AD-70741	67,82	3,49
AD-70742	92,93	14,66
AD-70743	59,32	9,95
AD-70744	81,97	6,05
AD-70745	54,96	7,81
AD-70562	46,21	8,44
AD-70563	44,88	5,69
AD-70564	67,82	20,32
AD-70565	52,32	12,39
AD-70566	53,22	10,43
AD-70567	46,28	10,21
AD-70568	41,84	3,91

045013

AD-70569	46,27	10,51
AD-70570	37,31	7,6
AD-70571	55,84	13,93
AD-70572	64,38	6,03
AD-70573	75,03	17,72
AD-70574	61,2	7,6
AD-70575	55,54	18,99
AD-70576	48,67	7,52
AD-70577	34,12	10,23
AD-70578	56,62	6,22
AD-70579	58,22	17,32
AD-70580	64,99	8,66
AD-70581	86,55	15,76
AD-70582	72,76	11,98
AD-70583	47,99	20,51
AD-70584	54	14,12
AD-70585	43,72	6,69
AD-70586	55,96	12,05
AD-70587	64,82	18,43
AD-70588	66,06	13,08
AD-70589	56,65	10,27
AD-70590	77,82	4,75
AD-70591	68,65	9,93
AD-70592	37,1	9,84
AD-70593	50,14	17,24
AD-70594	50,16	13,61
AD-70595	60,63	13,54
AD-70596	80,78	12,29
AD-70597	60,74	21,94
AD-70598	70,51	8,48
AD-70599	67,75	7,59
AD-70600	68,09	31,51
AD-70601	53,28	21,16
AD-70602	44,03	10,56

## 045013

AD-70603	87,08	40,51
AD-70604	69,39	9,62
AD-70605	86,92	27,74
AD-70606	62,19	7,28
AD-70607	67,55	19,57
AD-70608	98,46	10,23
AD-70609	77,67	10,72
AD-70610	108,45	21,97
AD-70611	73,02	19,12
AD-70612	97,49	26,26
AD-70613	65,22	19,24
AD-70614	96,69	21,51
AD-70615	76,53	7,96
AD-70616	69,73	12,06
AD-70617	58,38	10,85
AD-70618	73,89	22,5
AD-70619	85,32	25,92
AD-70620	72,03	33,04
AD-70621	83,22	24,59
AD-70622	108,98	14,93
AD-70623	71,28	32,49
AD-70624	67,8	25,27
AD-70625	52,08	10,91
AD-70626	40,94	13,75
AD-70627	33,55	3,35
AD-70628	52,37	10,46
AD-70629	53,46	4,07
AD-70630	47	8,42
AD-70631	64,51	42,23
AD-70632	30,66	4,32
AD-70633	33,64	12,21
AD-70634	65,42	6,92
AD-70635	45,84	6,76
AD-70636	47,83	6,63

AD-70637	64,39	8,42
AD-70638	38,91	8,35
AD-70639	40,87	7,79
AD-70640	50,87	13,34
AD-70641	49,64	5,85
AD-70642	44,04	8,02
AD-70643	61,04	11,12
AD-70644	50,03	9,07
AD-70645	67,35	28,98
AD-70646	50,93	6
AD-70647	83,29	5,96
AD-70648	53,57	15,44
AD-70649	46,35	8,99
AD-70650	52,06	7,83
AD-70651	64,65	9,04
AD-70652	100,8	9,21

Пример 11. In vivo сайленсинг F12 в мышинной модели проницаемости сосудов, индуцируемой горчичным маслом.

Как обсуждалось выше и продемонстрировано на фиг. 2 и 5, AD-67244 являлся наиболее эффективным средством, целенаправленно воздействующим на тестируемый ген F12, которое приводило в результате к устойчивому, дозозависимому снижению мРНК F12 и белка F12 в плазме крови у мышей дикого типа, и нормализации проницаемости сосудов в мышинной модели НАЕ с выходом жидкости из сосудов, индуцируемым брадикинином (мышинная модель с индуцированием ингибитором ACE).

In vivo эффективность AD-67244 также оценивали во второй мышинной модели НАЕ. В частности, способность AD-67244 обеспечивать восстановление проницаемости сосудов, индуцируемой горчичным маслом, у мышей с дефицитом по C1-INH определяли путем подкожного введения самкам мышей CD-1 (n=10/группу) однократной дозы 3, 0,5 или 0,1 AD-67244 в комбинации с однократной дозой 10 мг/кг двухнитевого средства на основе РНК, целенаправленно воздействующего на C1-INH в день -7. В день 0 синий краситель Эванса (30 мг/кг) вводили путем инъекции в хвостовую вену животных и 5% раствор горчичного масла наносили местно на правое ухо каждого животного (левое ухо оставалось необработанным и служило в качестве контроля). Через тридцать минут животных умерщвляли, каждое ухо отбирали для оценки экстравазации красителя с целью определения проницаемости сосудов, а печень отбирали для измерений мРНК F12 и C1-INH.

Как показано на фиг. 10А, введение однократной дозы 3, 0,5 или 0,1 мг/кг AD-67244 обеспечивало нормализацию проницаемости сосудов у этих мышей, и как показано на фиг. 10В, данное введение приводило в результате к устойчивому, дозозависимому снижению мРНК F12 в печени у этих животных. Уровень C1-INH в печени у этих животных составлял менее 0,01% от уровня C1-INH в печени группы, которой вводили контроль. Эти данные демонстрируют, что AD-67244 может уменьшать избыточную стимуляцию брадикинином.

Пример 12. In vivo сайленсинг F12 у отличных от человека приматов.

Для определения эффективности AD-67244 у отличных от человека приматов самкам яванского макака (n=3 на группу) подкожно вводили однократную дозу 3, 1, 0,3 или 0,1 мг/кг AD-67244. Уровни белка F12 в плазме крови яванского макака измеряли с помощью ELISA в дни -5, -3, -1, 3, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 112, 126 и 140 после введения дозы. На фиг. 11 продемонстрировано, что введение однократной дозы 0,3 мг/кг AD-67244 приводило в результате к более чем 85% снижению уровня белка F12. На фиг. 11 также продемонстрировано, что снижение уровня белка F12 было продолжительным с более чем 70% и 50% снижением в месяцы 2 и 3 после введения дозы соответственно.

Пример 13. Эффект 5'-модификации AD-67244 в отношении активности у мышей.

Эффект модификации 5'-фосфата антисмысловой нити AD-67244 в виде винилфосфата (VP) в отношении активности средства определяли у мышей. Мышам дикого типа (n=3/группу) вводили однократную дозу 0,5 мг/кг либо AD-67244 (смысловая нить: 5'-asascucaAfuAfAfAfgugcuuugaa-3' (SEQ ID NO: 1866); антисмысловая нить: 5'-usUfscaaAfgCfAfcuuuAfuUfgaguususc-3' (SEQ ID NO: 1867); ALN-F12), либо AD-74841 (смысловая нить: 5'-asascucaAfuAfAfAfgugcuuugaa-3' (SEQ ID NO: 1868); антисмысловая нить: 5'-VP-usUfscaaAfgCfAfcuuuAfuUfgaguususc-3' (SEQ ID NO: 1869); ALN-F12-VP). Уровень белка F12 в плазме крови определяли с помощью ELISA в дни 0, 3, 7, 15 и 21 после введения

дозы. На фиг. 12 продемонстрировано, что 5'-модификация фосфатной группы антисмысловой нити в виде винилфосфата обеспечивает умеренное повышение активности AD-67244.

Пример 14. Синтез и *In vitro* скрининг дуплексов siRNA для F12.

Дополнительные средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующие на F12, например целенаправленно воздействующие в пределах нуклеотидов 2000-2060 SEQ ID NO: 9, конструировали, синтезировали и подвергали скринингу в отношении *in vitro* эффективности, как описано выше. Подробный перечень дополнительных немодифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей F12 показан в табл. 23. Подробный перечень дополнительных модифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей F12 показан в табл. 24. В табл. 25 представлены результаты скрининга в отношении однократной дозы в клетках Hep3b, трансфицированных дополнительными iRNA для F12. Данные выражены в виде процента остаточной мРНК в сравнении с AD-1955.

Таблица 23. Немодифицированные последовательности F12

Название дуплекса	Смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO	Диапазон в SEQ ID NO:9	Антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO	Диапазон в SEQ ID NO:9
AD-70649, 2	GCCAGGAUGGCGCAGGAAA	1870	2004-2022	UUUCCUGCGCCAUCUGGC	1908	2004-2022
AD-75921, 1	CCAGGAUGGCGCAGGAACU	1871	2005-2023	AGUUCUGCGCCAUCUGG	1909	2005-2023
AD-75920, 1	CAGGAUGGCGCAGGAACUA	1872	2006-2024	UAGUUCUGCGCCAUCUG	1910	2006-2024
AD-75919, 1	AGGAUGGCGCAGGAACUCA	1873	2007-2025	UGAGUUCUGCGCCAUCU	1911	2007-2025
AD-75918, 1	GGAUGGCGCAGGAACUCAA	1874	2008-2026	UUGAGUUCUGCGCCAUC	1912	2008-2026
AD-75917, 1	GAUGGCGCAGGAACUCAU	1875	2009-2027	AUUGAGUUCUGCGCCAUC	1913	2009-2027
AD-75916, 1	AUGGCGCAGGAACUCAUA	1876	2010-2028	UAUUGAGUUCUGCGCCA	1914	2010-2028
AD-75915, 1	UGGCGCAGGAACUCAUAA	1877	2011-2029	UUAUUGAGUUCUGCGCCA	1915	2011-2029
AD-75914, 1	GGCGCAGGAACUCAUAAA	1878	2012-2030	UUUAUUGAGUUCUGCGCC	1916	2012-2030
AD-75913, 1	GCGCAGGAACUCAUAAAA	1879	2013-2031	UUUAUUGAGUUCUGCGC	1917	2013-2031
AD-75912, 1	CGCAGGAACUCAUAAAGU	1880	2014-2032	ACUUUAUUGAGUUCUGCG	1918	2014-2032
AD-70650, 2	GCAGGAACUCAUAAAGUA	1881	2015-2033	UACUUUAUUGAGUUCUG	1919	2015-2033
AD-75911, 1	CAGGAACUCAUAAAGUGA	1882	2016-2034	UCACUUUAUUGAGUUCU	1920	2016-2034
AD-75910, 1	AGGAACUCAUAAAGUGCU	1883	2017-2035	AGCACUUUAUUGAGUUCU	1921	2017-2035
AD-75909, 1	GGAACUCAUAAAGUGCUU	1884	2018-2036	AAGCACUUUAUUGAGUUC	1922	2018-2036
AD-75908, 1	GAACUCAUAAAGUGCUUU	1885	2019-2037	AAAGCACUUUAUUGAGUUC	1923	2019-2037
AD-75907, 1	AACUCAUAAAGUGCUUUA	1886	2020-2038	UAAAGCACUUUAUUGAGU	1924	2020-2038
AD-75906, 1	ACUCAUAAAGUGCUUUGA	1887	2021-2039	UCAAAGCACUUUAUUGAGU	1925	2021-2039
AD-75922, 1	UCAUAAAGUGCUUUGAAA	1888	2023-2041	UUUCAAAGCACUUUAUGA	1926	2023-2041
AD-75923, 1	CAUAAAGUGCUUUGAAAA	1889	2024-2042	UUUCAAAGCACUUUAUUG	1927	2024-2042
AD-70651, 2	AAUAAAGUGCUUUGAAAAU	1890	2025-2043	AUUUCAAAGCACUUUAUU	1928	2025-2043
AD-75924, 1	AUAAAGUGCUUUGAAAAUA	1891	2026-2044	UAUUUCAAAGCACUUUAU	1929	2026-2044
AD-75925, 1	UAAAGUGCUUUGAAAAUGA	1892	2027-2045	UCAUUUCAAAGCACUUUA	1930	2027-2045
AD-75926, 1	AAAGUGCUUUGAAAAUGCU	1893	2028-2046	AGCAUUUCAAAGCACUUU	1931	2028-2046
AD-75927, 1	AAGUGCUUUGAAAAUGCUA	1894	2029-2047	UAGCAUUUCAAAGCACUU	1932	2029-2047
AD-75928, 1	AGUGCUUUGAAAAUGCUGA	1895	2030-2048	UCAGCAUUUCAAAGCACU	1933	2030-2048
AD-75929, 1	GUGCUUUGAAAAUGCUGAA	1896	2031-2049	UUCAGCAUUUCAAAGCAC	1934	2031-2049
AD-75930, 1	UGCUUUGAAAAUGCUGAGA	1897	2032-2050	UCUCAGCAUUUCAAAGCA	1935	2032-2050
AD-75931, 1	GCUUUGAAAAUGCUGAGAA	1898	2033-2051	UUCUCAGCAUUUCAAAGC	1936	2033-2051
AD-75932, 1	CUUUGAAAAUGCUGAGAAA	1899	2034-2052	UUUCUCAGCAUUUCAAAG	1937	2034-2052
AD-75933, 1	UUUGAAAAUGCUGAGAAAA	1900	2035-2053	UUUUCUCAGCAUUUCAAA	1938	2035-2053
AD-70652, 2	UUGAAAAUGCUGAGAAAAA	1901	2036-2054	UUUUUCUCAGCAUUUCAAA	1939	2036-2054
AD-75934, 1	UGAAAAUGCUGAGAAAAAA	1902	2037-2055	UUUUUCUCAGCAUUUCA	1940	2037-2055
AD-75935, 1	GAAAAUGCUGAGAAAAAAA	1903	2038-2056	UUUUUUUCUCAGCAUUUUC	1941	2038-2056
AD-75936, 1	AAAAGCUGAGAAAAAAA	1904	2039-2057	UUUUUUUUUCUCAGCAUUU	1942	2039-2057
AD-75937, 1	AAAGCUGAGAAAAAAA	1905	2040-2058	UUUUUUUUUCUCAGCAUUU	1943	2040-2058
AD-75938, 1	AAUCGAGAAAAAAA	1906	2041-2059	UUUUUUUUUCUCAGCAUU	1944	2041-2059
AD-75939, 1	AUGCAGAAAAAAA	1907	2042-2060	UUUUUUUUUCUCAGCAU	1945	2042-2060

Таблица 24. Модифицированные последовательности F12

Название дуплекса	Смысловая последовательность, от 5' к 3'		Антисмысловая последовательность, от 5' к 3'		Целевая последовательность мРНК, 5' к 3'		Целевой участок мРНК в SEQ ID NO:9
	SEQ ID NO		SEQ ID NO		SEQ ID NO		
AD-70649	GCCAGGAUGGCGCAGGAAAdTdT	1946	UUUCCUGCGCCAUCUCCGdTdT	1984	GCCAGGAUGGCGCAGGAAAC	2022	2004-2022
AD-75921	CCAGGAUGGCGCAGGAACUdTdT	1947	AGUUCUGCGCCAUCUCCGdTdT	1985	CCAGGAUGGCGCAGGAAACU	2023	2005-2023
AD-75920	CAGGAUGGCGCAGGAACUAdTdT	1948	UAGUUCUGCGCCAUCUCCGdTdT	1986	CAGGAUGGCGCAGGAAACUC	2024	2006-2024
AD-75919	AGGAUGGCGCAGGAACUCAdTdT	1949	UGAGUUCUGCGCCAUCUCCdTdT	1987	AGGAUGGCGCAGGAACUCA	2025	2007-2025
AD-75918	GGAUGGCGCAGGAACUCAAdTdT	1950	UUGAGUUCUGCGCCAUCUCCdTdT	1988	GGAUGGCGCAGGAACUCAA	2026	2008-2026
AD-75917	GAUGGCGCAGGAACUCAAUdTdT	1951	AUUGAGUUCUGCGCCAUCdTdT	1989	GAUGGCGCAGGAACUCAAU	2027	2009-2027
AD-75916	AUGGCGCAGGAACUCAUAAdTdT	1952	UAUUGAGUUCUGCGCCAUCdTdT	1990	AUGGCGCAGGAACUCAUAU	2028	2010-2028
AD-75915	UGGCGCAGGAACUCAUAAdTdT	1953	UUUAUUGAGUUCUGCGCAdTdT	1991	UGGCGCAGGAACUCAUAUA	2029	2011-2029
AD-75914	GGCGCAGGAACUCAUAAdTdT	1954	UUUAUUGAGUUCUGCGCAdTdT	1992	GGCGCAGGAACUCAUAUA	2030	2012-2030
AD-75913	GCGCAGGAACUCAUAAdTdT	1955	UUUUUUGAGUUCUGCGCAdTdT	1993	GCGCAGGAACUCAUAUAAG	2031	2013-2031
AD-75912	CGCAGGAACUCAUAAGUdTdT	1956	ACUUUUAUUGAGUUCUCCGdTdT	1994	CGCAGGAACUCAUAUAAGU	2032	2014-2032
AD-70650	GCAGGAACUCAUAAGUAdTdT	1957	UACUUUUAUUGAGUUCUCCGdTdT	1995	GCAGGAACUCAUAUAAGUG	2033	2015-2033
AD-75911	CAGGAACUCAUAAGUGAdTdT	1958	UCACUUUUAUUGAGUUCUCCGdTdT	1996	CAGGAACUCAUAUAAGUGC	2034	2016-2034
AD-75910	AGGAACUCAUAAGUGCUdTdT	1959	AGCACUUUUAUUGAGUUCUCCdTdT	1997	AGGAACUCAUAUAAGUGCU	2035	2017-2035
AD-75909	GGAACUCAUAUAAGUGCUdTdT	1960	AAGCACUUUUAUUGAUCCdTdT	1998	GGAACUCAUAUAAGUGCUU	2036	2018-2036
AD-75908	GAACUCAUAUAAGUGCUUdTdT	1961	AAAGCACUUUUAUUGAUCCdTdT	1999	GAACUCAUAUAAGUGCUUU	2037	2019-2037
AD-75907	AACUCAUAUAAGUGCUUAdTdT	1962	UAAAGCACUUUUAUUGAUUdTdT	2000	AACUCAUAUAAGUGCUUUU	2038	2020-2038
AD-75906	ACUCAUAUAAGUGCUUUGAdTdT	1963	UCAAGCACUUUUAUUGAUUdTdT	2001	ACUCAUAUAAGUGCUUUUGA	2039	2021-2039
AD-75922	UCAUAUAAGUGCUUUGAAAdTdT	1964	UUUCAAGCACUUUUAUUGAdTdT	2002	UCAUAUAAGUGCUUUGAAA	2040	2023-2041
AD-75923	CAUAUAAGUGCUUUGAAAAdTdT	1965	UUUUCAAAGCACUUUUAUUGdTdT	2003	CAUAUAAGUGCUUUGAAAA	2041	2024-2042
AD-70651	AAUAUAAGUGCUUUGAAAAdTdT	1966	AUUUCAAAGCACUUUUAUdTdT	2004	AAUAUAAGUGCUUUGAAAAU	2042	2025-2043
AD-75924	AUAUAAGUGCUUUGAAAAdTdT	1967	UAUUUCAAAGCACUUUUAUdTdT	2005	AUAUAAGUGCUUUGAAAUG	2043	2026-2044
AD-75925	UAAAGUGCUUUGAAAUGAdTdT	1968	UCAUUUCAAAGCACUUUAdTdT	2006	UAAAGUGCUUUGAAAUGC	2044	2027-2045
AD-75926	AAAGUGCUUUGAAAUGCUdTdT	1969	AGCAUUUCAAAGCACUUUdTdT	2007	AAAGUGCUUUGAAAUGCU	2045	2028-2046
AD-75927	AAGUGCUUUGAAAUGCUAdTdT	1970	UAGCAUUUCAAAGCACUUdTdT	2008	AAGUGCUUUGAAAUGCUG	2046	2029-2047
AD-75928	AGUGCUUUGAAAUGCUGAdTdT	1971	UCAGCAUUUCAAAGCACUdTdT	2009	AGUGCUUUGAAAUGCUGA	2047	2030-2048
AD-75929	GUGCUUUGAAAUGCUGAAAdTdT	1972	UUCAGCAUUUCAAAGCACdTdT	2010	GUGCUUUGAAAUGCUGAG	2048	2031-2049
AD-75930	UGCUUUGAAAUGCUGAGAdTdT	1973	UCUCAGCAUUUCAAAGCAdTdT	2011	UGCUUUGAAAUGCUGAGA	2049	2032-2050
AD-75931	GCUUUGAAAUGCUGAGAAAdTdT	1974	UUCUCAGCAUUUCAAAGCAdTdT	2012	GCUUUGAAAUGCUGAGAA	2050	2033-2051
AD-75932	CUUUGAAAUGCUGAGAAAAdTdT	1975	UUUCUCAGCAUUUCAAAGdTdT	2013	CUUUGAAAUGCUGAGAAA	2051	2034-2052
AD-75933	UUUGAAAUGCUGAGAAAAdTdT	1976	UUUUCUCAGCAUUUCAAAdTdT	2014	UUUGAAAUGCUGAGAAAA	2052	2035-2053
AD-70652	UUGAAAUGCUGAGAAAAdTdT	1977	UUUUUCUCAGCAUUUCAAAdTdT	2015	UUGAAAUGCUGAGAAAA	2053	2036-2054
AD-75934	UGAAAUGCUGAGAAAAdTdT	1978	UUUUUUCUCAGCAUUUCAdTdT	2016	UGAAAUGCUGAGAAAA	2054	2037-2055
AD-75935	GAAAUGCUGAGAAAAdTdT	1979	UUUUUUUCUCAGCAUUUCdTdT	2017	GAAAUGCUGAGAAAA	2055	2038-2056
AD-75936	AAAUGCUGAGAAAAdTdT	1980	UUUUUUUCUCAGCAUUUdTdT	2018	AAAUGCUGAGAAAA	2056	2039-2057
AD-75937	AAUGCUGAGAAAAdTdT	1981	UUUUUUUCUCAGCAUUUdTdT	2019	AAUGCUGAGAAAA	2057	2040-2058
AD-75938	AAUGCUGAGAAAAdTdT	1982	UUUUUUUUUCUCAGCAUUdTdT	2020	AAUGCUGAGAAAA	2058	2041-2059
AD-75939	AUGCUGAGAAAAdTdT	1983	UUUUUUUUUUUCUCAGCAUdTdT	2021	AUGCUGAGAAAA	2059	2042-2060

Таблица 25. Скрининг в отношении однократной дозы для F12 в клетках Нер3b

ID дуплекса	10 нМ_средн.	10нМ_станд. отклон.	0,1 нМ_средн.	0,1 нМ, станд. отклон.
AD-70649,2	28,65	6,26	41,38	9,60
AD-75921,1	29,32	7,31	41,14	10,86
AD-75920,1	30,91	5,90	45,92	15,18
AD-75919,1	32,12	14,45	66,98	17,31
AD-75918,1	28,51	14,34	57,71	21,51
AD-75917,1	22,80	1,02	33,45	5,13
AD-75916,1	27,48	7,88	34,62	6,73
AD-75915,1	50,58	28,39	56,95	39,88
AD-75914,1	28,22	5,74	54,70	9,80
AD-75913,1	38,35	11,58	32,08	9,74
AD-75912,1	27,06	9,92	39,41	14,48
AD-70650,2	31,86	12,64	40,42	11,08
AD-75911,1	28,50	5,83	53,54	9,61
AD-75910,1	34,12	6,44	47,93	22,85
AD-75909,1	35,13	13,76	51,88	42,23
AD-75908,1	38,17	7,67	66,18	59,34
AD-75907,1	40,80	20,27	62,36	20,96
AD-75906,1	49,29	8,64	58,20	26,56
AD-75922,1	25,51	3,58	45,53	20,00
AD-75923,1	49,08	13,60	49,27	11,54
AD-70651,2	55,60	32,34	94,24	39,01
AD-75924,1	46,27	14,11	53,33	11,68
AD-75925,1	37,21	8,81	46,28	17,48
AD-75926,1	27,13	6,82	39,29	8,19
AD-75927,1	47,80	14,67	62,71	21,77
AD-75928,1	34,40	6,27	70,89	29,90
AD-75929,1	43,65	16,80	54,91	4,67
AD-75930,1	72,67	33,09	81,86	17,63
AD-75931,1	85,60	17,39	88,98	12,61
AD-75932,1	46,69	3,04	68,57	12,35
AD-75933,1	75,04	4,59	97,52	8,55
AD-70652,2	104,50	12,08	84,12	4,74
AD-75934,1	83,25	19,97	82,77	10,51
AD-75935,1	65,87	3,46	84,47	11,66
AD-75936,1	97,74	3,66	93,48	10,33
AD-75937,1	112,45	30,62	98,91	29,75
AD-75938,1	125,12	33,83	110,47	33,87
AD-75939,1	112,95	24,79	93,19	18,21

Пример 15. Оценка 5'-концевых модификаций дуплексов siRNA для F12.

Дополнительные средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующие на F12, содержащие нуклеотид, содержащий миметик 5'-фосфата, т.е. винилфосфат, конструировали, синтезировали и подвергали скринингу в отношении *in vitro* эффективности, как описано выше. Также конструировали, синтезировали и подвергали скринингу средства, содержащие одинаковые немодифицированные и модифицированные нуклеотидные последовательности этих средств, но без 5'-модификации в виде винилфосфата в антисмысловой нити, как описано выше. Подробный перечень всех этих дополнительных немодифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей F12 показан в табл. 26. Подроб-

ный перечень всех этих дополнительных модифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей F12 показан в табл. 27. В табл. 28 представлены результаты скрининга в отношении однократной дозы в клетках, представляющих собой первичные гепатоциты мыши, трансфицированных указанными средствами на основе dsRNA для F12.

In vivo эффективность поднабора этих соединений также оценивали путем подкожного введения мышам дикого типа однократной дозы 0,5 мг/кг средства и определения уровня белка F12 в плазме крови животных в дни 3, 7 и 15 после введения дозы. На фиг. 13 показаны результаты этих анализов и продемонстрировано, что добавление 5'-винилфосфата к антисмысловым нитям оказывает умеренный эффект в отношении in vivo эффективности указанных средств.

Таблица 26. F12 Немодифицированные последовательности F12

Название дуплекса	Смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO	Диапазон в SEQ ID NO:9
AD-73610	GGAGCCCAAGAAAGUGAAAGA	2060	UCUUUCACUUUCUUGGGCUCAA	2105	299-321
AD-73633	GGAGCCCAAGAAAGUGAAAGA	2061	UCUUUCACUUUCUUGGGCUCAA	2106	299-321
AD-73604	GAGCCCAAGAAAGUGAAAGAA	2062	UUCUUUCACUUUCUUGGGCUCCA	2107	300-322
AD-73627	GAGCCCAAGAAAGUGAAAGAA	2063	UUCUUUCACUUUCUUGGGCUCCA	2108	300-322
AD-73595	GCCCAAGAAAGUGAAAGACCA	2064	UGGUCUUUCACUUUCUUGGGCUC	2109	302-324
AD-73617	GCCCAAGAAAGUGAAAGACCA	2065	UGGUCUUUCACUUUCUUGGGCUC	2110	302-324
AD-73606	CCCAAGAAAGUGAAAGACCAA	2066	UUGGUCUUUCACUUUCUUGGGCU	2111	303-325
AD-73629	CCCAAGAAAGUGAAAGACCAA	2067	UUGGUCUUUCACUUUCUUGGGCU	2112	303-325
AD-73609	AAAGAGAAAUGCUUUGAGCCA	2068	UGGCUCAAGCAUUUCUCUUUCU	2113	426-448
AD-73632	AAAGAGAAAUGCUUUGAGCCA	2069	UGGCUCAAGCAUUUCUCUUUCU	2114	426-448
AD-73599	AAGAGAAAUGCUUUGAGCCUA	2070	UAGGCUCAAGCAUUUCUCUUUC	2115	427-449
AD-73621	AAGAGAAAUGCUUUGAGCCUA	2071	UAGGCUCAAGCAUUUCUCUUUC	2116	427-449
AD-73597	AGAGAAAUGCUUUGAGCCUCA	2072	UGAGGCUCAAGCAUUUCUCUUU	2117	428-450
AD-73619	AGAGAAAUGCUUUGAGCCUCA	2073	UGAGGCUCAAGCAUUUCUCUUU	2118	428-450
AD-73596	GAGAAAUGCUUUGAGCCUCA	2074	UUGAGGCUCAAGCAUUUCUCUU	2119	429-451
AD-73618	GAGAAAUGCUUUGAGCCUCA	2075	UUGAGGCUCAAGCAUUUCUCUU	2120	429-451
AD-73614	AGAAAUGCUUUGAGCCUCAGA	2076	UCUGAGGCUCAAGCAUUUCUCU	2121	430-452
AD-73637	AGAAAUGCUUUGAGCCUCAGA	2077	UCUGAGGCUCAAGCAUUUCUCU	2122	430-452
AD-73611	AAAUGCUUUGAGCCUCAGCUA	2078	UAGCUGAGGCUCAAGCAUUUCU	2123	432-454

AD-73634	AAAUGCUUUGAGCCUCAGCUA	2079	UAGCUGAGGCUCAAGCAUUUCU	2124	432-454
AD-73605	AUGCUUUGAGCCUCAGCUUCA	2080	UGAAGCUGAGGCUCAAGCAUUU	2125	434-456
AD-73628	AUGCUUUGAGCCUCAGCUUCA	2081	UGAAGCUGAGGCUCAAGCAUUU	2126	434-456
AD-73601	UGC UUUGAGCCUCAGCUUCUA	2082	UAGAAGCUGAGGCUCAAGCAUU	2127	435-457
AD-73624	UGC UUUGAGCCUCAGCUUCUA	2083	UAGAAGCUGAGGCUCAAGCAUU	2128	435-457
AD-73613	GCUUUGAGCCUCAGCUUCUCA	2084	UGAGAAGCUGAGGCUCAAGCAU	2129	436-458
AD-73636	GCUUUGAGCCUCAGCUUCUCA	2085	UGAGAAGCUGAGGCUCAAGCAU	2130	436-458
AD-73616	ACUCCACCUUCCUGCAGGAGA	2086	UCUCCUGCAGGAAGGUGGAGUAU	2131	1522-1544
AD-73639	ACUCCACCUUCCUGCAGGAGA	2087	UCUCCUGCAGGAAGGUGGAGUAU	2132	1522-1544
AD-73603	CACAGAAACUCAAAUAAAGUGA	2088	UCACUUUAUUGAGUUUCUGUGCC	2133	1927-1949
AD-73626	CACAGAAACUCAAAUAAAGUGA	2089	UCACUUUAUUGAGUUUCUGUGCC	2134	1927-1949
AD-73607	ACAGAAACUCAAAUAAAGUGCA	2090	UGCACUUUAUUGAGUUUCUGUGC	2135	1928-1950
AD-73630	ACAGAAACUCAAAUAAAGUGCA	2091	UGCACUUUAUUGAGUUUCUGUGC	2136	1928-1950
AD-73600	CAGAAACUCAAAUAAAGUGCUA	2092	UAGCACUUUAUUGAGUUUCUGUG	2137	1929-1951
AD-73622	CAGAAACUCAAAUAAAGUGCUA	2093	UAGCACUUUAUUGAGUUUCUGUG	2138	1929-1951
AD-73615	AGAAACUCAAAUAAAGUGCUUA	2094	UAAGCACUUUAUUGAGUUUCUGU	2139	1930-1952
AD-73638	AGAAACUCAAAUAAAGUGCUUA	2095	UAAGCACUUUAUUGAGUUUCUGU	2140	1930-1952
AD-73598	GAAACUCAAAUAAAGUGCUUUA	2096	UAAAGCACUUUAUUGAGUUUCUG	2141	1931-1953
AD-73620	GAAACUCAAAUAAAGUGCUUUA	2097	UAAAGCACUUUAUUGAGUUUCUG	2142	1931-1953
AD-73602	AAACUCAAAUAAAGUGCUUUGA	2098	UCAAGCACUUUAUUGAGUUUCU	2143	1932-1954
AD-73625	AAACUCAAAUAAAGUGCUUUGA	2099	UCAAGCACUUUAUUGAGUUUCU	2144	1932-1954
AD-73608	ACUCAAAUAAAGUGCUUUGAAA	2100	UUUCAAGCACUUUAUUGAGUUU	2145	1934-1956
AD-73631	ACUCAAAUAAAGUGCUUUGAAA	2101	UUUCAAGCACUUUAUUGAGUUU	2146	1934-1956
AD-73612	UCAAAUAAAGUGCUUUGAAAAA	2102	UUUUCAAAGCACUUUAUUGAGU	2147	1936-1958
AD-73635	UCAAAUAAAGUGCUUUGAAAAA	2103	UUUUCAAAGCACUUUAUUGAGU	2148	1936-1958
AD-73623	AACUCAAAUAAAGUGCUUUGAA	2104	UUCAAAGCACUUUAUUGAGUUUC	2149	1933-1955
AD-74838	AAUAAAGUGCUUUGAAAACGA	2333	UCGUUUUCAAGCACUUUAUUGA	2335	1938-1960
AD-74842	AAUAAAGUGCUUUGAAAACGA	2334	UCGUUUUCAAGCACUUUAUUGA	2336	1938-1960

Таблица 27. Модифицированные последовательности F12

Название дуплекса	Смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-73610	gsgsagccCfaAfGfAfaagugaagaL96	2150	usCfsuuCfaCfUfuucUfGfGfcuccsasa	2195	UUGGAGCCCAAGAAAGUGAAAGA	2240
AD-73633	gsgsagccCfaAfGfAfaagugaagaL96	2151	PusCfsuuCfaCfUfuucUfGfGfcuccsasa	2196	UUGGAGCCCAAGAAAGUGAAAGA	2241
AD-73604	gsasgcccAfaGfAfaagugaagaL96	2152	usUfscuuUfcAfCfuucUfGfGfcuccsasa	2197	UGGAGCCCAAGAAAGUGAAAGAC	2242
AD-73627	gsasgcccAfaGfAfaagugaagaL96	2153	PusUfscuuUfcAfCfuucUfGfGfcuccsasa	2198	UGGAGCCCAAGAAAGUGAAAGAC	2243
AD-73595	gscsccaaGfaAfGfAfaagugaagaL96	2154	usGfsgucUfuUfcfacuuUfUfugggcsusc	2199	GAGCCCAAGAAAGUGAAAGACCA	2244
AD-73617	gscsccaaGfaAfGfAfaagugaagaL96	2155	PusGfsgucUfuUfcfacuuUfUfugggcsusc	2200	GAGCCCAAGAAAGUGAAAGACCA	2245
AD-73606	cscsccaagAfaAfGfUfAfaagugaagaL96	2156	usUfsggucUfuUfUfcacuuUfUfugggcsusc	2201	AGCCCAAGAAAGUGAAAGACCAU	2246
AD-73629	cscsccaagAfaAfGfUfAfaagugaagaL96	2157	PusUfsggucUfuUfUfcacuuUfUfugggcsusc	2202	AGCCCAAGAAAGUGAAAGACCAU	2247
AD-73609	asasagagAfaAfUfGfUfAfaagugaagaL96	2158	usGfsgucUfaAfAfgcauUfUfcuuuscsu	2203	AGAAAGAGAAAGUGCUUUGAGCCU	2248
AD-73632	asasagagAfaAfUfGfUfAfaagugaagaL96	2159	PusGfsgucUfaAfAfgcauUfUfcuuuscsu	2204	AGAAAGAGAAAGUGCUUUGAGCCU	2249
AD-73599	asasagagaAfaUfGfCfuugagccuaL96	2160	usAfsggcUfcAfAfgcaUfUfcuuuscsu	2205	GAAAGAGAAAGUGCUUUGAGCCUC	2250
AD-73621	asasagagaAfaUfGfCfuugagccuaL96	2161	PusAfsggcUfcAfAfgcaUfUfcuuuscsu	2206	GAAAGAGAAAGUGCUUUGAGCCUC	2251
AD-73597	asgsagaaAfuGfCfUfuugagccuaL96	2162	usGfsaggCfuCfaaagCfaUfucucususu	2207	AAAGAGAAAGUGCUUUGAGCCUCA	2252
AD-73619	asgsagaaAfuGfCfUfuugagccuaL96	2163	PusGfsaggCfuCfaaagCfaUfucucususu	2208	AAAGAGAAAGUGCUUUGAGCCUCA	2253
AD-73596	gsasgaaaUfGfCfUfuugagccuaL96	2164	usUfsgagGfCfUfCfaaagCfaUfucucususu	2209	AAGAGAAAGUGCUUUGAGCCUCAG	2254
AD-73618	gsasgaaaUfGfCfUfuugagccuaL96	2165	PusUfsgagGfCfUfCfaaagCfaUfucucususu	2210	AAGAGAAAGUGCUUUGAGCCUCAG	2255
AD-73614	asgsaaaUfGfCfUfuugagccuaL96	2166	usCfsugaGfGfCfUfcaaaGfCafuuucscsu	2211	AGAGAAAGUGCUUUGAGCCUCAGC	2256
AD-73637	asgsaaaUfGfCfUfuugagccuaL96	2167	PusCfsugaGfGfCfUfcaaaGfCafuuucscsu	2212	AGAGAAAGUGCUUUGAGCCUCAGC	2257
AD-73611	asasaugcUfuUfGfAfgccucagcuaL96	2168	usAfsggcUfaGfGfCfUfaaGfcauuuscsu	2213	AGAAAGUGCUUUGAGCCUCAGCUU	2258
AD-73634	asasaugcUfuUfGfAfgccucagcuaL96	2169	PusAfsggcUfaGfGfCfUfaaGfcauuuscsu	2214	AGAAAGUGCUUUGAGCCUCAGCUU	2259
AD-73605	asusgcuUfGfAfgCfcucagcuaL96	2170	usGfsaggCfuGfAfggcuCfaAfagcaususu	2215	AAAGUCUUUGAGCCUCAGCUUCU	2260



## 045013

Таблица 28. Скрининг в отношении однократной дозы для F12 в первичных гепатоцитах мыши

ID дуплекса	Активность			
	10 нМ		0,1 нМ*	
	Средн.	Станд. отклон.	Средн.	Станд. отклон.
AD-67244	7,5	2,3	69,5	4,6
AD-73610	46,8	14,1	104,7	10,1
AD-73633	18,0	6,8	69,2	13,3
AD-73604	21,0	6,3	100,3	10,0
AD-73627	10,5	3,2	55,5	5,7
AD-73595	29,0	7,6	96,1	4,8
AD-73617	12,4	4,9	66,1	10,5
AD-73606	11,8	3,6	93,2	4,1
AD-73629	14,9	4,6	57,8	6,4
AD-73609	35,2	4,7	89,6	5,0
AD-73632	3,3	0,6	46,5	8,0
AD-73599	11,7	2,2	84,4	10,9
AD-73621	5,9	1,7	34,8	4,4
AD-73597	9,4	1,8	60,6	3,0
AD-73619	5,0	1,7	21,0	7,4
AD-73596	7,3	3,1	53,2	10,9
AD-73618	4,6	2,4	29,4	8,2
AD-73614	24,0	8,8	96,0	4,8
AD-73637	7,1	2,2	47,3	6,9
AD-73611	17,3	3,8	92,5	4,0
AD-73634	7,1	3,5	54,5	12,5
AD-73605	10,2	2,1	88,7	6,0
AD-73628	5,7	0,4	23,5	8,1
AD-73601	6,4	2,4	67,4	9,9
AD-73624	3,0	0,5	28,0	5,9
AD-73613	16,4	5,3	92,6	8,8
AD-73636	4,8	1,5	22,5	7,2
AD-73616	99,7	8,0	97,3	3,2
AD-73639	35,5	4,8	100,3	6,7
AD-73603	12,8	5,0	87,7	7,2
AD-73626	2,2	0,8	19,8	4,3
AD-73607	17,4	5,6	90,0	6,4
AD-73630	3,9	1,2	25,0	7,3
AD-73600	2,7	1,5	24,9	4,9
AD-73622	1,5	0,2	16,2	2,3
AD-73615	7,6	3,6	51,9	4,8
AD-73638	3,7	1,5	17,6	5,6
AD-73598	2,0	0,5	18,7	7,5
AD-73620	2,0	0,3	9,5	3,4
AD-73602	4,4	1,9	48,7	8,4
AD-73625	3,3	1,4	9,8	2,0
AD-73608	5,5	1,3	65,4	10,7
AD-73631	2,1	0,4	11,1	1,9
AD-73612	5,4	1,4	49,1	7,3
AD-73635	3,5	0,7	13,0	2,5
AD-73623	2,5	0,4	7,2	1,2

Эквиваленты.

Специалистам в данной области будет понятно, или они способны определить с применением лишь обычного экспериментирования наличие многих эквивалентов конкретных вариантов осуществления и способов настоящего изобретения, описанного в данном документе. Предполагается, что такие эквиваленты охвачены объемом следующей формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Двухнитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA) для ингибирования экспрессии фактора XII (фактора Хагемана) (F12), где указанная dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где указанная смысловая нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидов 144-174 нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 9, и указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из соответствующей части нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 10,

где смысловая нить составляет 19-21 нуклеотидов в длину и антисмысловая нить составляет 21-23 нуклеотидов в длину,

где все нуклеотиды смысловой цепи содержат нуклеотидную модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации,

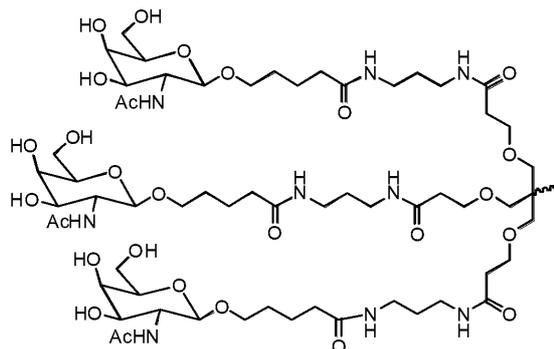
где смысловая нить содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце,

где все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат нуклеотидную модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации, 2'-фтор-модификации и 2'-дезоксид-нуклеотидной модификации,

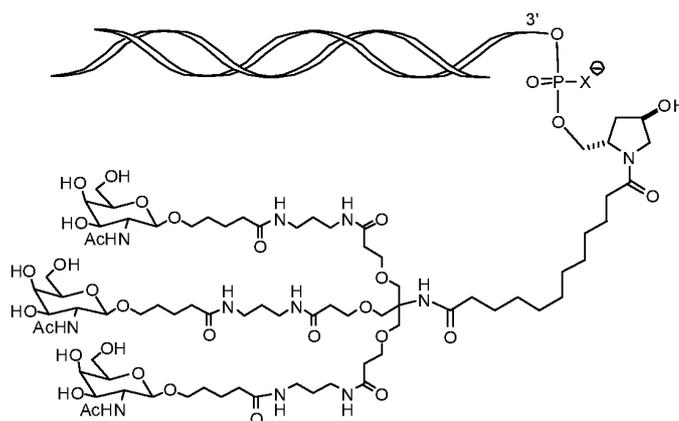
где антисмысловая нить содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи или на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи или на 3'-конце, и

где 3'-конец смысловой нити конъюгирован с лигандом,

который представляет собой



2. dsRNA по п.1, где средство на основе dsRNA конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:

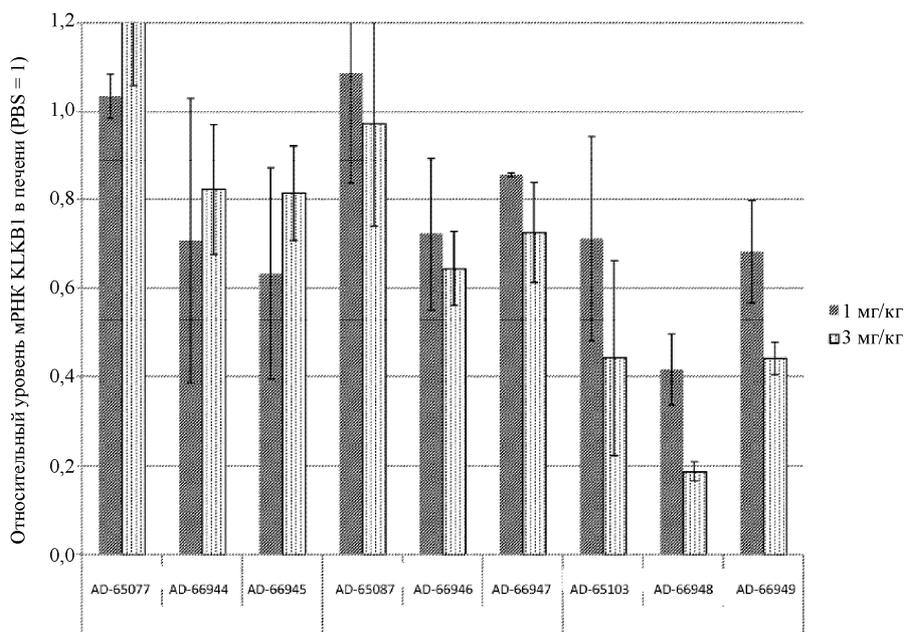


и где X представляет собой O или S.

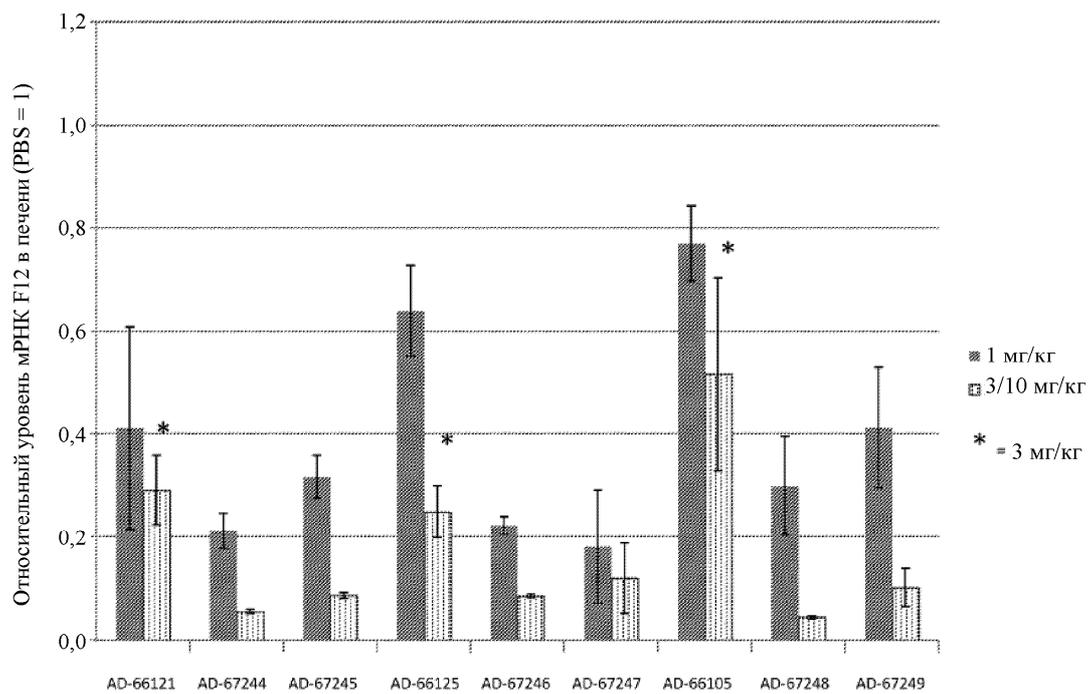
3. dsRNA по п.2, где X представляет собой O.

4. dsRNA по любому из пп.1-3, где смысловая и антисмысловая нити содержат смысловую и антисмысловую нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из 5'-AAGCUGAAGAGCACACAGU-3' (SEQ ID NO: 958); и 5'-ACUGUGUGCUCUCAGCUU-3' (SEQ ID NO: 1142); и 5'-ACACAGUCGUUCACUGU-3' (SEQ ID NO: 959); и 5'-ACAGUGAGAACGACUGUGU-3' (SEQ ID NO: 1143).

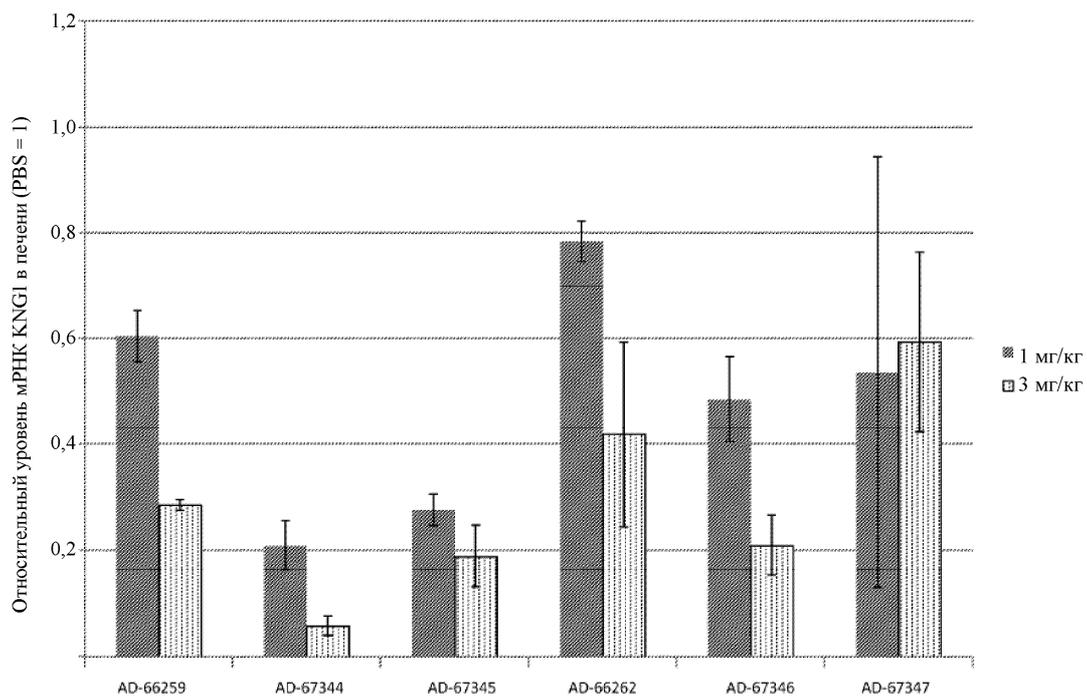
5. Выделенная клетка, содержащая dsRNA по любому из пп.1-4.
6. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена F12, содержащая dsRNA по любому из пп.1-4.
7. Фармацевтическая композиция по п.6, где dsRNA присутствует в незабуференном растворе.
8. Фармацевтическая композиция по п.7, где указанная dsRNA присутствует в буферном растворе.
9. Фармацевтическая композиция по п.6, где dsRNA присутствует в буферном растворе.
10. Фармацевтическая композиция по п.9, где указанный буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию.
11. Фармацевтическая композиция по п.9, где указанный буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (PBS).
12. Способ *in vitro* ингибирования экспрессии F12 в клетке, при этом способ предусматривает:
  - (а) приведение клетки в контакт с dsRNA по любому из пп.1-4 или фармацевтической композицией по любому из пп.6-11; и
  - (б) поддержание клетки, полученной на стадии (а), в течение времени, достаточного для обеспечения разрушения мРНК-транскрипта гена F12, за счет чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена F12 в клетке.
13. Способ по п.12, где экспрессию F12 ингибируют по меньшей мере на приблизительно 30%, на приблизительно 40%, на приблизительно 50%, на приблизительно 60%, на приблизительно 70%, на приблизительно 80%, на приблизительно 90%, на приблизительно 95%, на приблизительно 98% или на приблизительно 100%.
14. Способ ингибирования экспрессии гена F12 у млекопитающего, включающий введение млекопитающему dsRNA по любому из пп.1-4 или фармацевтической композиции по любому из пп.6-11.
15. Способ по п.14, где млекопитающее представляет собой субъекта-человека.
16. Способ по п.15, где субъект-человек страдает заболеванием или нарушением, выбранным из группы, состоящей из тромбофилии, наследственного ангионевротического отека (НАЕ), дефицита фактора Флетчера и первичной гипертензии.



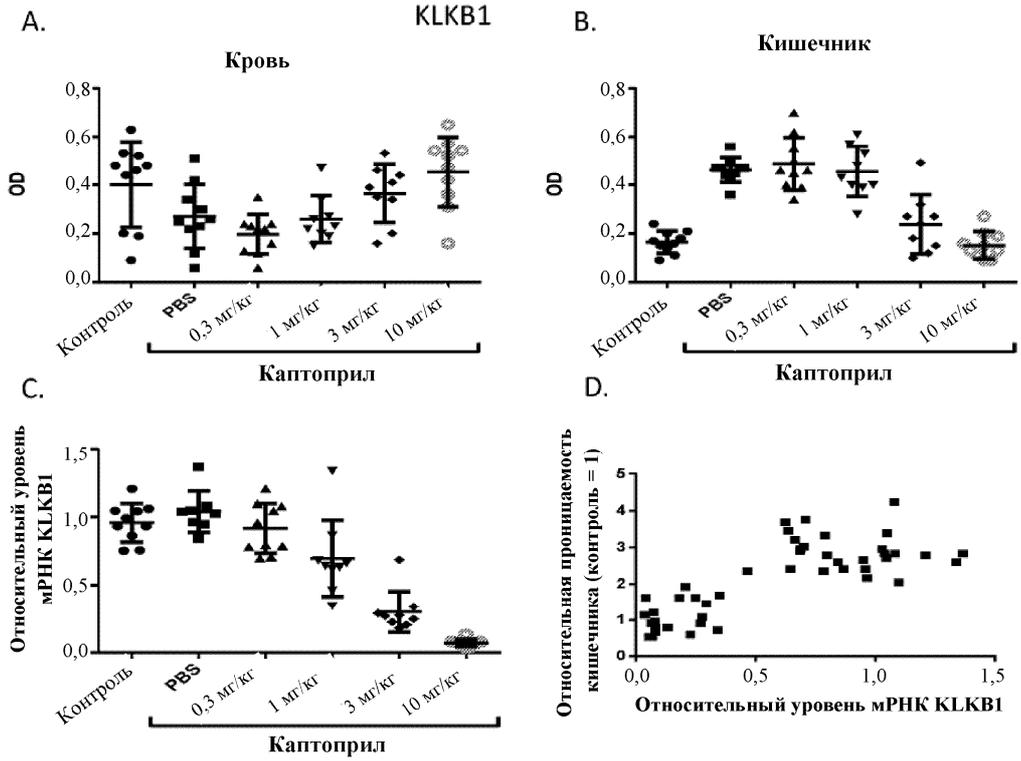
Фиг. 1



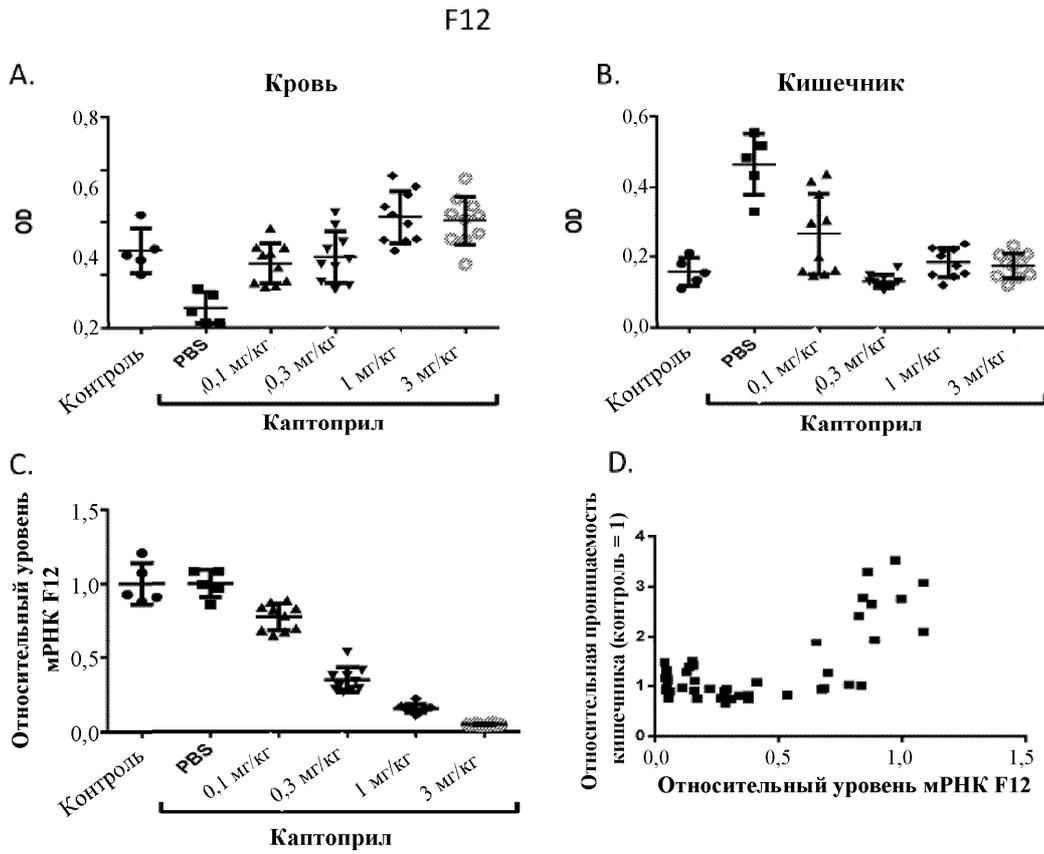
Фиг. 2



Фиг. 3

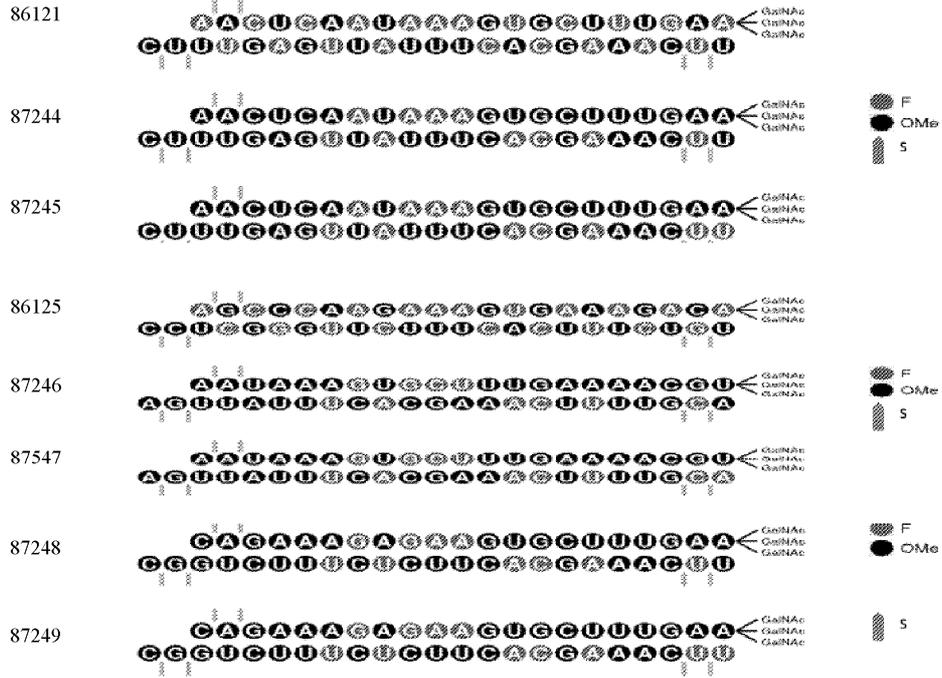


Фиг. 4

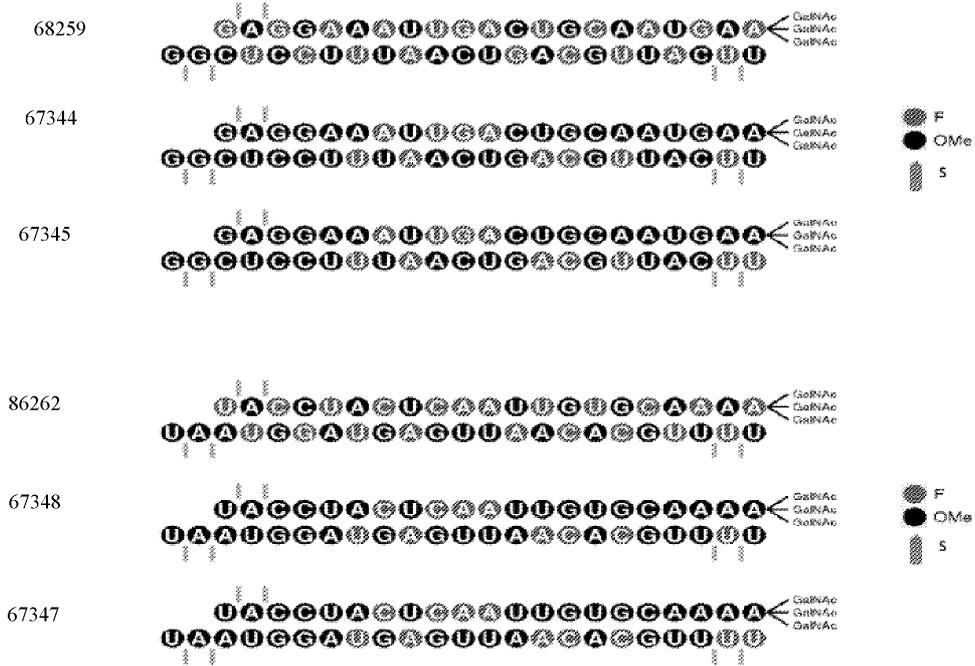


Фиг. 5



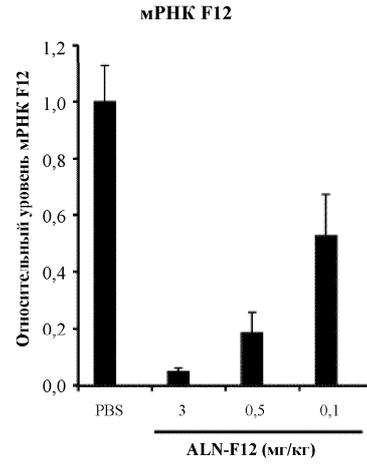
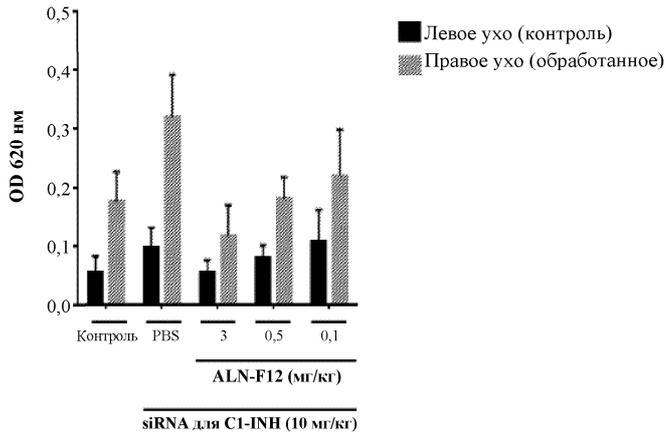


Фиг. 8



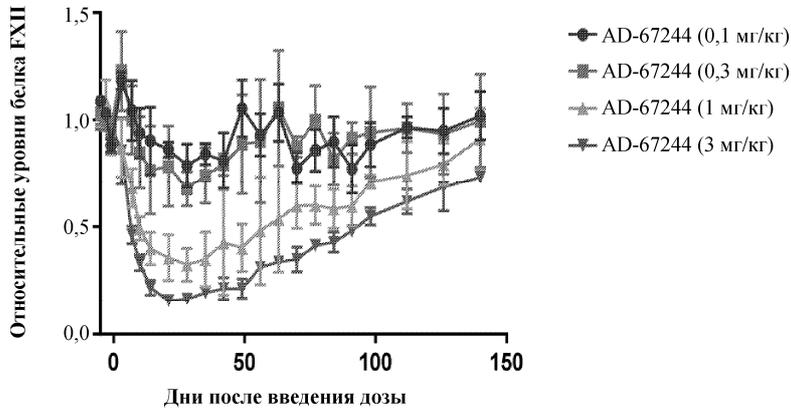
Фиг. 9

Выделение красителя из тканей уха



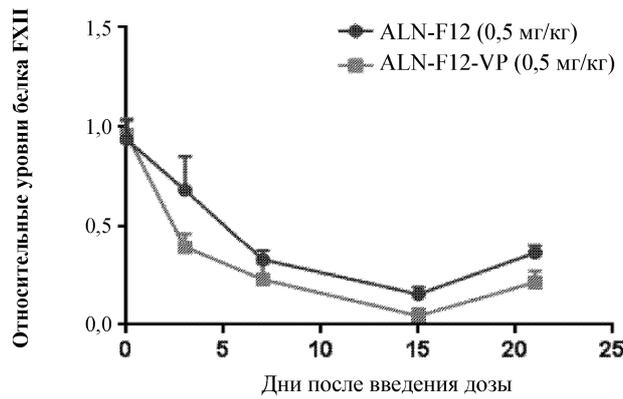
Фиг. 10А, В

Уровни FXII в плазме крови у яванского макака

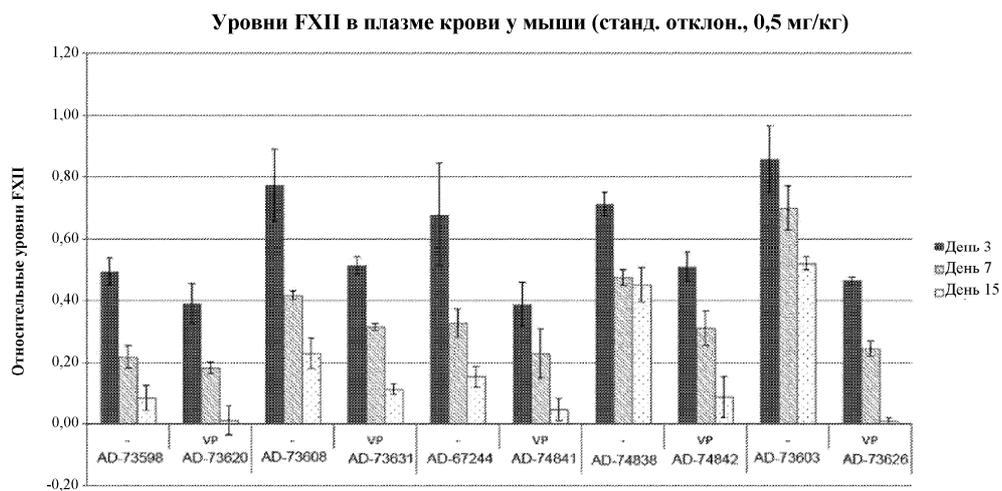


Фиг. 11

Уровни FXII в плазме крови у мыши



Фиг. 12



Фиг. 13



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2