

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291496 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.30

(22) Дата подачи заявки
2016.04.13

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/071 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ iRNA ПРОТИВ АНГИОПОЭТИН-ПОДОБНОГО БЕЛКА 3 (ANGPTL3) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/146,604; 62/261,361

(32) 2015.04.13; 2015.12.01

(33) US

(62) 201792263; 2016.04.13

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

(72) Изобретатель:
Куэрбс Уилльям, Фитцджеральд
Кевин, Батлер Джеймс, Уилльямс
Стефани, Хинкл Грегори, Майер
Мартин (US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к композициям на основе двухнитевых рибонуклеиновых кислот (dsRNA), целенаправленно воздействующим на ген ANGPTL3, а также к способам ингибирования экспрессии ANGPTL3 и способам лечения субъектов, имеющих нарушение метаболизма липидов, такое как гиперлипидемия или гипертриглицеридемия, с помощью таких композиций на основе dsRNA.

A1

202291496

202291496

A1

КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ *irna* ПРОТИВ АНГИОПОЭТИН-ПОДОБНОГО БЕЛКА 3 (ANGPTL3) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета по предварительной заявке на патент США № 62/146604, поданной 13 апреля 2015 г., и предварительной заявке на патент США № 62/261361, поданной 1 декабря 2015 г. Полное содержание каждой из вышеупомянутых заявок настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная ASCII-копия, созданная 12 апреля 2016 г., имеет название 121301-03320_SL.txt, и ее размер составляет 213246 байт.

Предпосылки изобретения

Ангиопоэтин-подобный белок 3 (ANGPTL3) является представителем семейства ангиопоэтин-подобных секретируемых факторов, который регулирует метаболизм липидов и экспрессируется преимущественно в печени (Koishi, R. et al., (2002) *Nat. Genet.* 30(2):151-157). ANGPTL3 осуществляет двойное ингибирование форм каталитической активности липопротеинлипазы (LPL), которая катализирует гидролиз триглицеридов, и эндотелиальной липазы (EL), которая гидролизует фосфолипиды липопротеинов высокой плотности (HDL). У мышей KK/Snk, имеющих гипOLIпидемию и в то же время ожирение, снижение экспрессии ANGPTL3 оказывает защитный эффект против гиперлипидемии и атеросклероза, способствуя выведению триглицеридов (Ando et al., (2003) *J. Lipid Res.*, 44:1216-1223). Концентрации ANGPTL3 человека в плазме крови положительно коррелируют с уровнями холестерина HDL и фосфолипидов HDL в плазме крови (Shimamura et al., (2007) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 27:366-372).

Нарушения метаболизма липидов могут приводить к повышению уровней липидов сыворотки крови, таких как триглицериды и/или холестерин. Повышенные уровни липидов сыворотки крови в

значительной степени связаны с высоким кровяным давлением, сердечно-сосудистым заболеванием, диабетом и другими патологическими состояниями. Гипертриглицеридемия является примером нарушения метаболизма липидов, характеризующимся высокими уровнями триглицеридов в крови. Она ассоциирована с атеросклерозом даже при отсутствии высоких уровней холестерина (гиперхолестеринемии). Если концентрации триглицеридов являются избыточными (т. е. превышают 1000 мг/дл или 12 ммоль/л), гипертриглицеридемия также может приводить к панкреатиту. Гиперлипидемия является другим примером нарушения метаболизма липидов, характеризующимся повышенными уровнями любого или всех липидов и/или липопротеинов в крови. Существующие методы лечения нарушений метаболизма липидов, в том числе соблюдение диеты, выполнение физических упражнений и лечение статинами и другими лекарственными средствами, не всегда являются эффективными. Соответственно, в данной области техники существует необходимость в альтернативных методах лечения субъектов, имеющих нарушения метаболизма липидов.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение предусматривает композиции на основе iRNA, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена ANGPTL3. Ген ANGPTL3 может находиться в клетке, например, в клетке в организме субъекта, такого как человек. Настоящее изобретение также предусматривает способы применения композиций на основе iRNA по настоящему изобретению для ингибирования экспрессии гена ANGPTL3 и/или для лечения субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие ингибирование или снижение экспрессии гена ANGPTL3, например, субъекта, страдающего или предрасположенного к страданию нарушением метаболизма липидов, такого как субъект, страдающий или предрасположенный к страданию гиперлипидемией или гипертриглицеридемией.

Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение предусматривает двухнитевые рибонуклеиновые кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии ANGPTL3. DsRNA содержат смысловую нить

и антисмысловую нить, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, а антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5. В определенных вариантах осуществления dsRNA содержат смысловую нить и антисмысловую нить, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых последовательностей, перечисленных в любой из таблиц 2A, 2B, 4A, 4B, 5, 7A, 7B, 7C, 8A, 8B, 10A, 10B, 13A, 13B, 14, 15A и 15B.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает двухнитевые рибонуклеиновые кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии ANGPTL3. DsRNA содержат 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 нуклеотидных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из

- 5' - GAAUAUGUCACUUGAACUCAA - 3' (SEQ ID NO: 14)
- 5' - UTGAGUUCAAGTGACAUAUUCUU - 3' (SEQ ID NO: 15),
- 5' - GAAUATGUGACUUGAACUCAA - 3' (SEQ ID NO: 16)
- 5' - UUGAGUUCAAGUGACAUAUUCUU - 3' (SEQ ID NO: 17),
- 5' - AUUAAGCUGCUUCUUUTUAUU - 3' (SEQ ID NO: 18)
- 5' - AAUAAAAAGAAGGAGCUUAAUUG - 3' (SEQ ID NO: 19),
- 5' - ACAUAUUUGAUCAGUCUUUUU - 3' (SEQ ID NO: 20)
- 5' - AAAAAGACUGAUCAAAUAUGUUG - 3' (SEQ ID NO: 21);
- 5' - UGUCACUUGAACUCAACUCAA - 3' (SEQ ID NO: 22)
- 5' - UUGAGUUGAGUUCAAGUGACUA - 3' (SEQ ID NO: 23);
- 5' - AACUAACUAACUUAUUCAAA - 3' (SEQ ID NO: 24)
- 5' - UUUGAAUUAAGUUAGUUAGUUGC - 3' (SEQ ID NO: 25);
- 5' - UCACAAUUAAGCUCCUUCUUU - 3' (SEQ ID NO: 26)
- 5' - AAAGAAGGAGCUUAAUUGUGAAC - 3' (SEQ ID NO: 27);
- 5' - GAGCAACUAACUAACUUAUUU - 3' (SEQ ID NO: 28)
- 5' - AAUUAAGUUAGUUAGUUGCUCUU - 3' (SEQ ID NO: 29);

5' - UUAUUGUUCCUCUAGUUAUUU- 3' (SEQ ID NO: 30)
 5' - AAAUAACUAGAGGAACAAUAAAA - 3' (SEQ ID NO: 31);
 5' - AUUAAGCUCCUUCUUUUUAUU - 3' (SEQ ID NO: 32)
 5' - AAUAAAAAGAAGGAGCUUAAUUG - 3' (SEQ ID NO: 33);
 5' - GAAUAUGUCACUUGAACUCAA - 3' (SEQ ID NO: 34)
 5' - UUGAGUUCAAGUGACAUAUUCUU - 3' (SEQ ID NO: 35);
 5' - CAACAUAUUUGAUCAGUCUUU - 3' (SEQ ID NO: 36)
 5' - AAAGACUGAUCAAAUAUGUUGAG - 3' (SEQ ID NO: 37); и
 5' - CUCCAUAGUGAAGCAAUCUAA - 3' (SEQ ID NO: 38)
 5' - UUAGAUUGCUUCACUAUGGAGUA - 3' (SEQ ID NO: 39).

В определенных вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити содержат нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из

5' - GAAUAUGUCACUUGAACUCAA - 3' (SEQ ID NO: 14)
 5' - UTGAGUUCAAGTGACAUAUUCUU - 3' (SEQ ID NO: 15),
 5' - GAAUATGUGACUUGAACUCAA - 3' (SEQ ID NO: 16)
 5' - UUGAGUUCAAGUGACAUAUUCUU - 3' (SEQ ID NO: 17),
 5' - AUUAAGCUGCUUCUUUTUAUU - 3' (SEQ ID NO: 18)
 5' - AAUAAAAAGAAGGAGCUUAAUUG - 3' (SEQ ID NO: 19),
 5' - ACAUAUUUGAUCAGUCUUUUU - 3' (SEQ ID NO: 20)
 5' - AAAAAGACUGAUCAAAUAUGUUG - 3' (SEQ ID NO: 21);
 5' - UGUCACUUGAACUCAACUCAA - 3' (SEQ ID NO: 22)
 5' - UUGAGUUGAGUUCAAGUGACUA - 3' (SEQ ID NO: 23);
 5' - AACUAACUAACUUAUUCUAAA - 3' (SEQ ID NO: 24)
 5' - UUUGAAUUAAGUUAGUUAGUUGC - 3' (SEQ ID NO: 25);
 5' - UCACAAUUAAGCUCCUUCUUU - 3' (SEQ ID NO: 26)
 5' - AAAGAAGGAGCUUAAUUGUGAAC - 3' (SEQ ID NO: 27);
 5' - GAGCAACUAACUAACUAAUU - 3' (SEQ ID NO: 28)
 5' - AAUUAAGUUAGUUAGUUGCUCUU - 3' (SEQ ID NO: 29);
 5' - UUAUUGUUCCUCUAGUUAUUU- 3' (SEQ ID NO: 30)
 5' - AAAUAACUAGAGGAACAAUAAAA - 3' (SEQ ID NO: 31);
 5' - AUUAAGCUCCUUCUUUUUAUU - 3' (SEQ ID NO: 32)
 5' - AAUAAAAAGAAGGAGCUUAAUUG - 3 (SEQ ID NO: 33)';
 5' - GAAUAUGUCACUUGAACUCAA - 3' (SEQ ID NO: 34)
 5' - UUGAGUUCAAGUGACAUAUUCUU - 3' (SEQ ID NO: 35);
 5' - CAACAUAUUUGAUCAGUCUUU - 3' (SEQ ID NO: 36)

5' - AAAGACUGAUCAAAUAUGUUGAG - 3' (SEQ ID NO: 37); и

5' - CUCCAUAUGUGAAGCAAUCUAA - 3' (SEQ ID NO: 38)

5' - UUAGAUUGCUUCACUAUGGAGUA - 3' (SEQ ID NO: 39).

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 модифицированные нуклеотиды независимо выбраны из группы, состоящей из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего 5'-фосфотиоатную группу, и концевого нуклеотида, связанного с холестерилловым производным или бисдециламидной группой додекановой кислоты. В определенных вариантах осуществления модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из: 2'-дезокси-2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, нуклеотида с удаленными основаниями, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата и нуклеотида, содержащего не встречающееся в природе основание.

В определенных вариантах осуществления dsRNA содержит участок комплементарности длиной по меньшей мере 17 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления dsRNA содержит участок комплементарности длиной 19 и 23 нуклеотида. В определенных

вариантах осуществления dsRNA содержит участок комплементарности длиной 19 нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления каждая нить dsRNA имеет длину не более 30 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления dsRNA имеет длину по меньшей мере 15 нуклеотидов.

В других вариантах осуществления одна или обе из нитей двухнитевых средств для RNAi по настоящему изобретению имеют длину до 66 нуклеотидов, например, длину 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 нуклеотида, с участком по меньшей мере из 19 смежных нуклеотидов, практически комплементарным по меньшей мере части мРНК-транскрипта гена INSR. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити образуют дуплекс из 18-30 смежных нуклеотидов.

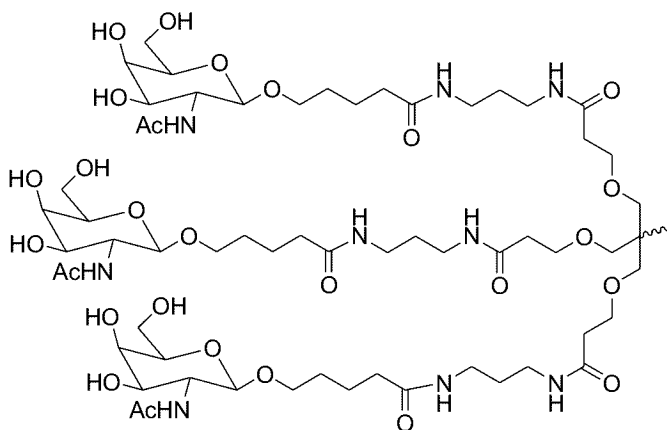
В одном варианте осуществления по меньшей мере одна нить средства для RNAi содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например, из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9,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

В определенных вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi дополнительно содержит лиганд. В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой N-ацетилгалактозамин (GalNAc). Лиганд может представлять собой одну или несколько молекул GalNAc, присоединенных к средству для RNAi посредством одновалентного, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера. Лиганд может быть конъюгирован с 3'-концом смысловой нити двухнитевого средства для RNAi, 5'-концом смысловой нити двухнитевого средства для RNAi, 3'-концом антисмысловой нити

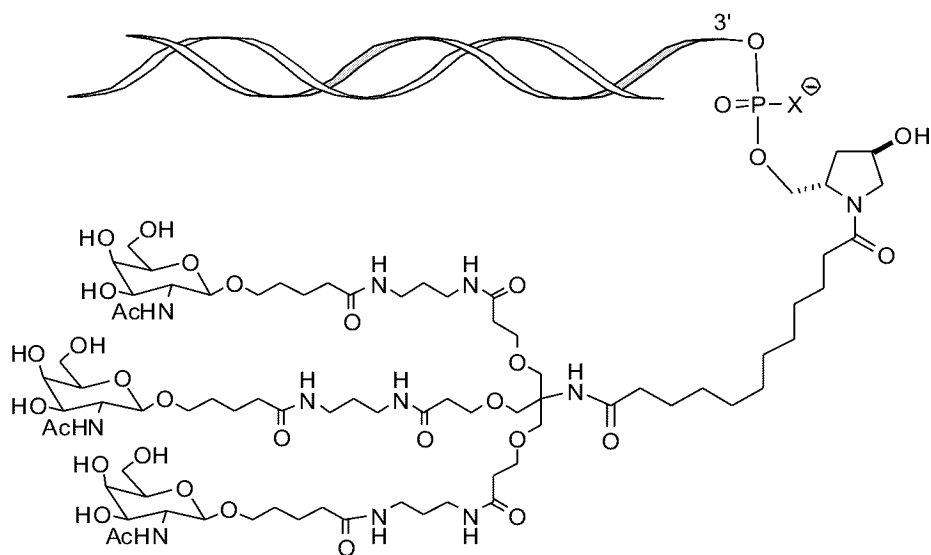
двухнитевого средства для RNAi или 5'-концом антисмысловой нити двухнитевого средства для RNAi.

В некоторых вариантах осуществления двухнитевые средства для RNAi по настоящему изобретению содержат множество, например, 2, 3, 4, 5 или 6, молекул GalNAc, каждая из которых независимо присоединена к множеству нуклеотидов двухнитевого средства для RNAi посредством множества одновалентных линкеров.

В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой



В определенных вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



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

В определенных вариантах осуществления dsRNA содержит дуплекс, выбранный из группы, состоящей из AD-57927.6, AD-63133,1, AD-63136,1, AD-63137,1, AD-63139,1, AD-63142,1, AD-

63143,1, AD-63144,1, AD-63145,1, AD-63148,1, AD-63149,1, AD-63150,1, AD-63151,1, AD-63153,1, AD-63154,1, AD-63156,1, AD-63157,1, AD-63160,1, AD-63162,1, AD-63163,1, AD-63167,1, AD-63168,1, AD-63170,1, AD-63173,1, AD-63174,1, AD-63175,1, AD-63176,1, AD-63177,1, AD-63179,1, AD-63181,1, AD-66916, AD-66920, AD-66921, AD-66923, AD-66922, AD-66917, AD-66918, AD-66919, AD-66924, AD66925 и AD-63185.1. В определенных вариантах осуществления dsRNA содержит дуплекс, выбранный из группы, состоящей из AD-57927.6, AD-63136,1, AD-63137,1, AD-63142,1, D-63148,1, AD-63151,1, AD-63156,1, AD-63157,1, AD-63160,1, AD-63163,1, AD-63167,1, AD-63170,1, AD-63173,1, AD-63174,1, AD-63176,1, AD-66916, AD-66920, AD-66921, AD-66923, AD-66922, AD-66917, AD-66918, AD-66919, AD-66924, AD66925, AD-67173, AD-67174, AD-67007, и AD-63179.1. В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая нити dsRNA содержат нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из

- 5' - ascsauauUfuGfAfUfcagucuuuuu -- 3' (SEQ ID NO: 40)
- 5' - asAfsaaaGfacugaucAfaAfuaugusug-- 3' (SEQ ID NO: 41);
- 5' - usgsucacUfuGfAfAfcucaacucaaL96 -- 3' (SEQ ID NO: 42)
- 5' - usUfsgagUfuGfAfguucAfaGfugacasusa -- 3' (SEQ ID NO: 43);
- 5' - gsasauauGfuCfAfCfuugaacucaa -3' (SEQ ID NO: 44)
- 5' - usdTsgaguucaagdTgdAcauauucsusu -- 3' (SEQ ID NO: 45);
- 5' - gsasauadTgudGacuugaa(Cgn)ucca -- 3' (SEQ ID NO: 46)
- 5' - usUfsgagUfuCfAfagugAfcAfuaucsu -- 3' (SEQ ID NO: 47);
- 5' - asusuaadGcudGcuucuuu(Tgn)uauu -- 3' (SEQ ID NO: 48)
- 5' - asAfsuaaAfaagaaggAfgCfuuaausug -- 3' (SEQ ID NO: 49);
- 5' - AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf -3' (SEQ ID NO: 50)
- 5' - asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug - 3' (SEQ ID NO: 51);
- 5' - UfsgsUfcAfcUfuGfAfAfcUfcAfaCfuCfaAf -3' (SEQ ID NO: 52)
- 5' - usUfsgAfgUfuGfaGfuucAfaGfuGfaCfasusa - 3' (SEQ ID NO: 53);

5' - asascuaaCfuAfAfCfuuaauucaaa -3' (SEQ ID NO: 54),
 5' - usUfsugaAfuUfAfaguuAfgUfuaguusgsc - 3' (SEQ ID NO:
 55);
 5' - uscsacaaUfuAfAfGfcuccuucuuu -3' (SEQ ID NO: 56)
 5' - asAfsagaAfgGfAfgcuuAfaUfugugasasc - 3' (SEQ ID NO:
 57);
 5' - gsasgcaaCfuAfAfCfuaacuuaauu -3' (SEQ ID NO: 58)
 5' - asAfsuuaAfgUfUfaguuaGfuUfgcucsusu - 3' (SEQ ID NO:
 59);
 5' - ususauugUfuCfCfUfcuaguuaauu -3' (SEQ ID NO: 60)
 5' - asAfsauaAfcUfAfgaggAfaCfaauaasasa - 3' (SEQ ID NO:
 61);
 5' - asusuaagCfuCfCfUfucuuuuuauu -3' (SEQ ID NO: 62)
 5' - asAfsuaaAfaAfGfaaggAfgCfuuaaususg - 3' (SEQ ID NO:
 63);
 5' - gsasauauGfuCfAfCfuugaacucuaa -3' (SEQ ID NO: 64)
 5' - usUfsgagUfuCfAfagugAfcAfuauucsusu - 3' (SEQ ID NO:
 65);
 5' - csasacauAfuUfUfGfaucagucuuu -3' (SEQ ID NO: 66)
 5' - asAfsagaCfuGfAfucuaaAfuAfuguugsasg - 3' (SEQ ID NO:
 67); и
 5' - csusccauAfgUfGfAfagcaaucuaa -3' (SEQ ID NO: 68)
 5' - usUfsagaUfuGfCfuucaCfuAfuggagsusa - 3' (SEQ ID NO:
 69).

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает клетки, содержащие dsRNA, предусмотренные в данном документе.

В еще одном аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтические композиции для ингибирования экспрессии гена ANGPTL3. Композиции содержат средства на основе dsRNA, предусмотренные в данном документе. В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции дополнительно содержат липидный состав.

Настоящее изобретение также предусматривает способы ингибирования экспрессии ANGPTL3 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с dsRNA, описанной в данном документе; и выдерживание клетки в течение времени, достаточного

для достижения разрушения мРНК-транскрипта гена ANGPTL3, за счет чего осуществляется ингибирование экспрессии гена ANGPTL3 в клетке.

В определенных вариантах осуществления клетка находится в организме субъекта. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления субъект-человек страдает нарушением метаболизма липидов. В определенных вариантах осуществления нарушение метаболизма липидов представляет собой гиперлипидемию или гипертриглицеридемию. В определенных вариантах осуществления экспрессия ANGPTL3 ингибируется по меньшей мере на приблизительно 30%.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способы лечения субъекта, имеющего нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии ANGPTL3. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из dsRNA, предусмотренных в данном документе, за счет чего осуществляется лечение субъекта. В определенных вариантах осуществления нарушение представляет собой нарушение метаболизма липидов. В определенных вариантах осуществления нарушение метаболизма липидов представляет собой гиперлипидемию или гипертриглицеридемию. В определенных вариантах осуществления введение dsRNA субъекту вызывает уменьшение уровня одного или нескольких липидов сыворотки крови и/или уменьшение накопления белка ANGPTL3.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение также предусматривает способы ингибирования экспрессии ANGPTL3 у субъекта. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из dsRNA, предусмотренных в данном документе, за счет чего осуществляется ингибирование экспрессии ANGPTL3 у субъекта.

В еще одном аспекте настоящее изобретение предусматривает наборы для осуществления способов по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает набор для осуществления способа ингибирования экспрессии гена ANGPTL3 в клетке путем приведения клетки в

контакт с двухнитевым средством для RNAi по настоящему изобретению в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии ANGPTL3 в клетке. Набор содержит средство для RNAi и инструкции по применению, а также необязательно приспособления для введения средства для RNAi субъекту.

Краткое описание графических материалов

Фигура 1 представляет собой график, на котором показано количество мРНК ANGPTL3, остающейся в день 3 в сыворотке крови самок мышей ob/ob после одной подкожной дозы 30 мг/кг, 10 мг/кг или 3 мг/кг указанных средств на основе iRNA. Количество мРНК ANGPTL3 представлено в виде соотношения количества мРНК ANGPTL3 и количества мРНК GAPDH в образце относительно соотношения количества мРНК ANGPTL3 и количества мРНК GAPDH в контрольном образце (PBS).

Фигура 2 представляет собой график, на котором показаны эффекты введения нескольких доз (3 мг/кг каждый день в течение 5 дней на протяжении недели 1, затем 3 мг/кг два раза в неделю в недели 2-4 (3,0 мг/кг qd x 5; qw x 6)) AD-57927 в отношении уровней белка ANGPTL3 в сыворотке крови у самок мышей ob/ob. Количество белка ANGPTL3 представлено относительно количества белка ANGPTL3, присутствующего в образце сыворотки крови до введения AD-57927.

Фигура 3 представляет собой график, на котором показаны эффекты введения нескольких доз (3 мг/кг каждый день в течение 5 дней на протяжении недели 1, затем 3 мг/кг два раза в неделю в недели 2-4 (3,0 мг/кг qd x 5; qw x 6)) AD-57927 в отношении уровней триглицеридов (TG) у самок мышей ob/ob. Количество TG представлено относительно количества TG, присутствующих в образце сыворотки крови до введения AD-57927.

Фигура 4 представляет собой график, на котором показаны эффекты введения нескольких доз (3 мг/кг каждый день в течение 5 дней на протяжении недели 1, затем 3 мг/кг два раза в неделю в недели 2-4 (3,0 мг/кг qd x 5; qw x 6)) AD-57927 в отношении уровней холестерина LDL (LDLc) у самок мышей ob/ob. Количество LDLc представлено относительно количества LDLc, присутствующего в образце сыворотки крови до введения AD-57927.

Фигура 5 представляет собой график, на котором показаны эффекты введения нескольких доз (3 мг/кг каждый день в течение 5 дней на протяжении недели 1, затем 3 мг/кг два раза в неделю в недели 2-4 (3,0 мг/кг qd x 5; qw x 6)) AD-57927 в отношении уровней общего холестерина (Тс) у самок мышей ob/ob. Количество Тс представлено относительно количества Тс, присутствующего в образце сыворотки крови до введения AD-57927.

Фигура 6А представляет собой график, на котором показана продолжительность ответа на указанные средства на основе iRNA, представленная количеством белка ANGPTL3 мыши, остающимся в сыворотке крови мышей дикого типа после одной подкожной дозы 3 мг/кг указанных средств на основе iRNA с течением времени. Количество белка ANGPTL3 мыши представлено относительно количества белка ANGPTL3 мыши, присутствующего в образце сыворотки крови до введения.

Фигура 6В представляет собой график, на котором показано количество белка ANGPTL3 мыши, остающегося в сыворотке крови мышей дикого типа после одной подкожной дозы 3 мг/кг указанных средств на основе iRNA в день 10 после приема дозы. Количество белка ANGPTL3 мыши представлено относительно количества белка ANGPTL3 мыши, присутствующего в образце сыворотки крови до введения.

Фигура 7А представляет собой график, на котором показана продолжительность ответа на указанные средства на основе iRNA, представленная количеством белка ANGPTL3 мыши, остающимся в сыворотке крови мышей дикого типа после одной подкожной дозы 3 мг/кг указанных средств на основе iRNA с течением времени. Количество белка ANGPTL3 мыши представлено относительно количества белка ANGPTL3 мыши, присутствующего в образце сыворотки крови до введения.

Фигура 7В представляет собой график, на котором показано количество белка ANGPTL3 мыши, остающегося в сыворотке крови мышей дикого типа после одной подкожной дозы 1 мг/кг или 3 мг/кг указанных средств на основе iRNA в день 5 после приема дозы. Количество белка ANGPTL3 мыши представлено относительно количества белка ANGPTL3 мыши, присутствующего в образце

сыворотки крови до введения.

Фигура 8А представляет собой график, на котором показана продолжительность ответа на указанные средства на основе iRNA, представленная количеством белка ANGPTL3 мыши, остающимся в сыворотке крови мышей *ob/ob* после одной подкожной дозы 3 мг/кг указанных средств на основе iRNA с течением времени. Количество белка ANGPTL3 мыши представлено относительно количества белка ANGPTL3 мыши, присутствующего в образце сыворотки крови до введения.

Фигура 8В представляет собой график, на котором показана процентная величина сайленсинга гена белка ANGPTL3 мыши в сыворотке крови мышей *ob/ob* после одной подкожной дозы 1 мг/кг или 3 мг/кг указанных средств на основе iRNA в день 5 после приема дозы. Процентная величина сайленсинга гена белка ANGPTL3 мыши представлена относительно уровня белка ANGPTL3 мыши, присутствующего в образце сыворотки крови до введения.

Фигура 9 представляет собой график, на котором показана процентная величина сайленсинга гена белка ANGPTL3 мыши в сыворотке крови мышей *ob/ob* после одной подкожной дозы 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг или 9 мг/кг AD-65695 в день 5 после приема дозы. Процентная величина сайленсинга гена белка ANGPTL3 мыши представлена относительно уровня белка ANGPTL3 мыши, присутствующего в образце сыворотки крови до введения.

Фигура 10А представляет собой график, на котором показаны эффекты одной подкожной дозы 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг или 9 мг/кг AD-65695 (ALN-ANG) в отношении уровней триглицеридов (TG) у мышей *ob/ob*. Количество TG представлено в виде соотношения количества TG в образце сыворотки крови от мыши, которой вводили AD-65695, относительно количества TG в образце сыворотки крови от мыши, которой вводили PBS.

Фигура 10В представляет собой график, на котором показаны эффекты одной подкожной дозы 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг или 9 мг/кг AD-65695 (ALN-ANG) в отношении уровней общего холестерина (ТС) у мышей *ob/ob*. Количество ТС представлено в виде соотношения количества ТС в образце сыворотки крови от мыши, которой вводили AD-65695, относительно количества ТС в образце

сыворотки крови от мыши, которой вводили PBS.

Фигура 1^oC представляет собой график, на котором показаны эффекты одной подкожной дозы 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг или 9 мг/кг AD-65695 (ALN-ANG) в отношении уровней холестерина липопротеинов низкой плотности (LDLc) у мышей *ob/ob*. Количество LDLc представлено в виде соотношения количества LDLc в образце сыворотки крови от мыши, которой вводили AD-65695, относительно количества LDLc в образце сыворотки крови от мыши, которой вводили PBS.

Фигура 10D представляет собой график, на котором показаны эффекты одной подкожной дозы 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг или 9 мг/кг AD-65695 (ALN-ANG) в отношении соотношения уровней холестерина липопротеинов высокой плотности (HDL) и уровней общего холестерина (TC) у мышей *ob/ob*.

На фигуре 11 изображен режим дозирования и план исследования для определения продолжительности функционирования указанных средств на основе iRNA у мышей дикого типа (C57BL/6), инфицированных путем внутривенного введения 1×10^{11} вирусных частиц вектора на основе аденоассоциированного вируса 8 типа (AAV8), кодирующего ген ANGPTL3 человека (кодирующий участок), управляемый печеночноспецифическим промотором гена тироксинсвязывающего глобулина (TBG) (AAV8-TBG-ANGPTL3).

Фигура 12A представляет собой график, на котором показана продолжительность ответа на указанные средства на основе iRNA, представленная количеством белка ANGPTL3 человека, остающимся в сыворотке крови мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3, после одной подкожной дозы 3 мг/кг указанных средств на основе iRNA с течением времени. Количество белка ANGPTL3 человека представлено относительно количества белка ANGPTL3 человека, присутствующего в образце сыворотки крови до введения (до приема дозы).

Фигура 12B представляет собой график, на котором показана продолжительность ответа на указанные средства на основе iRNA, представленная количеством белка ANGPTL3 мыши, остающимся в сыворотке крови мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3, после одной подкожной дозы 3 мг/кг указанных средств на основе iRNA с

течением времени. Количество белка ANGPTL3 мыши представлено относительно количества белка ANGPTL3 мыши, присутствующего в образце сыворотки крови до введения (до приема дозы).

На фигуре 13 изображен режим дозирования и план исследования для подбора дозы и определения продолжительности функционирования указанных средств на основе iRNA у мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3.

Фигура 14A представляет собой график, на котором показано количество белка ANGPTL3 человека, остающегося в сыворотке крови мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3, после одной подкожной дозы 3 мг/кг, 1 мг/кг или 0,3 мг/кг указанных средств на основе iRNA в день 11 после приема дозы. Количество белка ANGPTL3 человека представлено относительно количества белка ANGPTL3 человека, присутствующего в образце сыворотки крови до введения (до приема дозы).

Фигура 14B представляет собой график, на котором показана продолжительность ответа на указанные средства на основе iRNA, представленная количеством белка ANGPTL3 мыши, остающимся в сыворотке крови мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3, после одной подкожной дозы 3 мг/кг, 1 мг/кг или 0,3 мг/кг указанных средств на основе iRNA в день 11 после приема дозы. Количество белка ANGPTL3 мыши представлено относительно количества белка ANGPTL3 мыши, присутствующего в образце сыворотки крови до введения (до приема дозы).

Фигура 15A представляет собой график, на котором показана продолжительность ответа на указанные средства на основе iRNA, представленная количеством белка ANGPTL3 человека, остающимся в сыворотке крови мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3, после одной подкожной дозы 3 мг/кг, 1 мг/кг или 0,3 мг/кг указанных средств на основе iRNA с течением времени. Количество белка ANGPTL3 человека представлено относительно количества белка ANGPTL3 человека, присутствующего в образце сыворотки крови до введения (до приема дозы).

Фигура 15B представляет собой график, на котором показана продолжительность ответа на указанные средства на основе iRNA, представленная количеством белка ANGPTL3 мыши, остающимся в

сыворотке крови мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3, после одной подкожной дозы 3 мг/кг, 1 мг/кг или 0,3 мг/кг указанных средств на основе iRNA с течением времени. Количество белка ANGPTL3 мыши представлено относительно количества белка ANGPTL3 мыши, присутствующего в образце сыворотки крови до введения (до приема дозы).

Фигура 16 представляет собой график, на котором показана продолжительность ответа на указанные средства на основе iRNA, представленная количеством белка ANGPTL3 человека, остающимся в сыворотке крови мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3, после одной подкожной дозы 1 мг/кг указанных средств на основе iRNA с течением времени. Количество белка ANGPTL3 человека представлено относительно количества белка ANGPTL3 человека, присутствующего в образце сыворотки крови до введения (до приема дозы).

Фигура 17A представляет собой график, на котором изображено количество белка ANGPTL3 человека, остающегося в сыворотке крови мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3, после одной подкожной дозы 1 мг/кг или 3 мг/кг указанных средств на основе iRNA в день 14 после приема дозы. Количество белка ANGPTL3 человека представлено относительно количества белка ANGPTL3 человека, присутствующего в образце сыворотки крови до введения (до приема дозы).

Фигура 17B представляет собой график, на котором изображено количество белка ANGPTL3 человека, остающегося в сыворотке крови мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3, после одной подкожной дозы 1 мг/кг или 3 мг/кг указанных средств на основе iRNA в день 28 после приема дозы. Количество белка ANGPTL3 человека представлено относительно количества белка ANGPTL3 человека, присутствующего в образце сыворотки крови до введения (до приема дозы).

Фигура 18A представляет собой график, на котором изображено количество белка ANGPTL3 человека, остающегося в сыворотке крови мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3, после одной подкожной дозы 1 мг/кг или 3 мг/кг указанных средств на основе iRNA в день 14 после приема дозы. Количество белка ANGPTL3 человека представлено относительно количества белка ANGPTL3 человека,

присутствующего в образце сыворотки крови до введения (до приема дозы) .

Фигура 18B представляет собой график, на котором изображено количество белка ANGPTL3 человека, остающегося в сыворотке крови мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3, после одной подкожной дозы 1 мг/кг или 3 мг/кг указанных средств на основе iRNA в день 28 после приема дозы. Количество белка ANGPTL3 человека представлено относительно количества белка ANGPTL3 человека, присутствующего в образце сыворотки крови до введения (до приема дозы) .

Фигура 19A представляет собой график, на котором показана продолжительность ответа на указанные средства на основе iRNA, представленная количеством белка ANGPTL3 макака-крабоеда, остающимся в сыворотке крови тощих макаков-крабоедов, которым вводили одну дозу 1 мг/кг или 3 мг/кг указанных средств на основе iRNA, с течением времени. Количество белка ANGPTL3 макаки-крабоеда представлено относительно количества белка ANGPTL3 человека, присутствующего в образце сыворотки крови до введения (до приема дозы) .

Фигура 19B представляет собой график, на котором показано процентное количество триглицеридов, остающихся в сыворотке крови макаков-крабоедов, которым вводили одну дозу 1 мг/кг или 3 мг/кг указанных средств на основе iRNA, с течением времени. Количество триглицеридов представлено относительно количества триглицеридов макаки-крабоеда, присутствующих в образце сыворотки крови до введения (до приема дозы) .

Фигура 20 представляет собой график, на котором изображено количество белка ANGPTL3 человека, остающегося в сыворотке крови мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3, после одной подкожной дозы 1 мг/кг указанных средств на основе iRNA в день 28 после приема дозы. Количество белка ANGPTL3 человека представлено относительно количества белка ANGPTL3 человека, присутствующего в образце сыворотки крови до введения (до приема дозы) .

Фигура 21A представляет собой график, на котором изображено количество белка ANGPTL3 человека, остающегося в сыворотке крови мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3, после одной подкожной

дозы 1 мг/кг указанных средств на основе iRNA в день 28 после приема дозы. Количество белка ANGPTL3 человека представлено относительно количества белка ANGPTL3 человека, присутствующего в образце сыворотки крови до введения (до приема дозы).

Фигура 21В представляет собой график, на котором изображено количество белка ANGPTL3 мыши, остающегося в сыворотке крови мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3, после одной подкожной дозы 1 мг/кг указанных средств на основе iRNA в день 28 после приема дозы. Количество белка ANGPTL3 человека представлено относительно количества белка ANGPTL3 человека, присутствующего в образце сыворотки крови до введения (до приема дозы).

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение предусматривает композиции на основе iRNA, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена ANGPTL3. Ген ANGPTL3 может находиться в клетке, например, в клетке в организме субъекта, такого как человек. Настоящее изобретение также предусматривает способы применения композиций на основе iRNA по настоящему изобретению для ингибирования экспрессии гена ANGPTL3 и/или для лечения субъекта, имеющего нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие ингибирование или снижение экспрессии гена ANGPTL3, например, нарушение метаболизма липидов, такое как гиперлипидемия или гипертриглицеридемия.

iRNA по настоящему изобретению могут содержать нить РНК (антисмысловую нить), имеющую участок, который имеет длину приблизительно 30 нуклеотидов или меньше, например, длину 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, причем этот участок практически комплементарен по меньшей мере части мРНК-транскрипта гена ANGPTL3.

В других вариантах осуществления одна или обе из нитей

двухнитевых средств для RNAi по настоящему изобретению имеют длину до 66 нуклеотидов, например, длину 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 нуклеотида, с участком по меньшей мере из 19 смежных нуклеотидов, практически комплементарным по меньшей мере части мРНК-транскрипта гена ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити образуют дуплекс из 18-30 смежных нуклеотидов.

Применение этих средств на основе iRNA, описанных в данном документе, обеспечивает возможность целенаправленного разрушения мРНК гена ANGPTL3 у млекопитающих. Очень низкие дозы iRNA против ANGPTL3 могут, в частности, специфично и эффективно опосредовать РНК-интерференцию (RNAi), приводя в результате к значительному ингибированию экспрессии гена ANGPTL3. С помощью клеточных анализов и анализов *in vivo* авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что iRNA, целенаправленно воздействующие на ANGPTL3, могут опосредовать RNAi, что приводит в результате к значительному ингибированию экспрессии гена ANGPTL3. Таким образом, способы и композиции, предусматривающие эти iRNA, применимы для лечения субъекта, на которого снижение уровней и/или активности белка ANGPTL3 будет оказывать благоприятное воздействие, такого как субъект, имеющий нарушение метаболизма липидов, такое как гиперлипидемия или гипертриглицеридемия.

В некоторых вариантах осуществления средства на основе iRNA по настоящему изобретению содержат нить РНК (антисмысловую нить), которая может иметь длину до 66 нуклеотидов, например, длину 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 нуклеотида, с участком по меньшей мере из 19 смежных нуклеотидов, практически комплементарным по меньшей мере части мРНК-транскрипта гена ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления такие средства на основе iRNA, имеющие антисмысловые нити большей длины, могут содержать вторую нить РНК (смысловую нить) длиной 20-60 нуклеотидов, где смысловая и антисмысловая нити образуют дуплекс из 18-30 смежных нуклеотидов.

В следующем подробном описании раскрывается то, как получать и применять композиции, содержащие iRNA, для ингибирования экспрессии гена ANGPTL3, а также композиции и

способы лечения субъектов, имеющих заболевания и нарушения, на которые будет оказывать благоприятное воздействие ингибирование и/или снижение экспрессии данного гена.

I. Определения

Для того чтобы настоящее изобретение можно было легче понять, вначале даны определения некоторым терминам. В дополнение, 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 на иное.

Термин "ANGPTL3" относится к ангиопоэтин-подобному белку 3, имеющему аминокислотную последовательность из любого источника из позвоночных или млекопитающих, в том числе без ограничения человека, быка, курицы, грызуна, мыши, крысы, свиньи, овцы, примата, обезьяны и морской свинки, если не указано иное. Данный термин также относится к фрагментам и вариантам нативного ANGPTL3, сохраняющим по меньшей мере одну форму активности *in vivo* или *in vitro* нативного ANGPTL3. Данный термин охватывает полноразмерные непротессированные формы-предшественники ANGPTL3, а также зрелые формы, получаемые в результате посттрансляционного отщепления сигнального пептида, и формы, получаемые в результате протеолитического процессинга фибриноген-подобного домена. Последовательность мРНК-транскрипта ANGPTL3 человека можно найти, например, под № доступа в GenBank GI: 452408443 (NM_014495.3; SEQ ID NO: 1). Предсказанную

последовательность мРНК ANGPTL3 макаки-резуса можно найти, например, под № доступа в GenBank GI: 297278846 (XM_001086114.2; SEQ ID NO: 2). Последовательность мРНК мышинного ANGPTL3 можно найти, например, под № доступа в GenBank GI: 142388354 (NM_013913.3; SEQ ID NO: 3). Последовательность мРНК ANGPTL3 крысы можно найти, например, под № доступа в GenBank GI: 68163568 (NM_001025065.1; SEQ ID NO: 4). Дополнительные примеры последовательностей мРНК ANGPTL3 являются легкодоступными в общедоступных базах данных, например, в GenBank, UniProt и OMIM.

Термин "ANGPTL3", используемый в данном документе, также относится к конкретному полипептиду, экспрессируемому в клетке геном ANGPTL3 со встречающимися в природе вариантами последовательности ДНК, такими как однонуклеотидный полиморфизм в гене ANGPTL3. Многочисленные SNP в гене ANGPTL3 были идентифицированы и могут быть найдены, например, в dbSNP NCBI (см., например, www.ncbi.nlm.nih.gov/snp). Неограничивающие примеры SNP в гене ANGPTL3 можно найти под № доступа в dbSNP NCBI rs193064039; rs192778191; rs192764027; rs192528948; rs191931953; rs191293319; rs191171206; rs191145608; rs191086880; rs191012841 или rs190255403.

Используемый в данном документе термин "последовательность-мишень" относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образующейся в процессе транскрипции гена ANGPTL3, в том числе мРНК, которая является продуктом процессинга РНК первичного продукта транскрипции. В одном варианте осуществления часть-мишень 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 ANGPTL3.

Последовательность-мишень может иметь длину приблизительно 9-36 нуклеотидов, например, иметь длину приблизительно 15-30 нуклеотидов. Например, последовательность-мишень может иметь длину 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. Диапазоны и значения длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам и значениям 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 относиться к модифицированному нуклеотиду, более подробно описанному ниже, или имитирующему заменяющему фрагменту (см., например, таблицу 1). 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 своего основания, может образовывать пары 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 мРНК-мишенью. 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 разрушение 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 ANGPTL3 в клетке, например, в клетке в организме субъекта, такого как субъект-млекопитающее.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению включает в себя одонитевую РНК, которая взаимодействует с последовательностью-мишенью РНК, например, последовательностью-мишенью мРНК ANGPTL3, управляя расщеплением РНК-мишени. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, предполагают, что длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, разрушается до siRNA эндонуклеазой III типа, известной как 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 включаются в состав РНК-индуцируемого комплекса 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 мРНК-мишенью одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень, индуцируя сайленсинг (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188). Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к одонитевой РНК (sssiRNA), образуемой внутри клетки, которая способствует образованию RISC-комплекса для осуществления сайленсинга гена-мишени, т. е. гена ANGPTL3. Соответственно, термин "siRNA" также используют в данном документе для

обозначения RNAi, что описано выше.

В другом варианте осуществления средство для RNAi может представлять собой одонитевое средство для RNAi, которое вводят в клетку или организм для ингибирования мРНК-мишени. Одонитевые средства для RNAi (ssRNAi) связываются с RISC-эндонуклеазой Argonaute 2, которая затем расщепляет мРНК-мишень. Одонитевые siRNA, как правило, содержат 15-30 нуклеотидов и являются химически модифицированными. Конструирование и тестирование одонитевых средств для RNAi описано 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 использовать 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 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, имеющему дуплексную структуру, содержащую две антипараллельные и практически комплементарные нити нуклеиновой кислоты, рассматриваемые как имеющие "смысловую" и "антисмысловую" ориентации по отношению к РНК-мишени, т. е. гену ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения двухнитевая РНК (dsRNA) запускает разрушение РНК-мишени, например, мРНК, посредством механизма посттранскрипционного сайленсинга генов, называемого 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.

В дополнение, используемый в настоящем описании термин "средство для RNAi" может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; средство для RNAi может содержать 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, термин "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 в себя все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных из уровня техники. Любые такие модификации, которые используются в молекуле типа siRNA, охвачены термином "средство для RNAi" в контексте данных описания и формулы изобретения.

Дуплексный участок может иметь любую длину, которая обеспечивает возможность специфического разрушения желаемой РНК-мишени посредством пути с участием RISC, и может иметь длину в диапазоне от приблизительно 9 до 36 пар оснований, например, иметь длину приблизительно 15-30 пар оснований, например, иметь длину 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, длину 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. Диапазоны и значения длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам и значениям длины, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Две нити, образующие дуплексную структуру, могут являться различными частями одной более крупной молекулы РНК, или они

могут являться 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 до 5'-конца соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, то 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 до 5'-конца соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, 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. В дополнение к дуплексной структуре, средство для RNAi может содержать один или несколько нуклеотидных выступающих концов.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению представляет собой dsRNA, каждая нить которой содержит 19-23 нуклеотида, которая взаимодействует с последовательностью-мишенью РНК, например, с последовательностью-мишенью мРНК ANGPTL3, для управления расщеплением РНК-мишени. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, предполагают, что длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, разрушается до siRNA эндонуклеазой III типа, известной как 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 включаются в состав РНК-индуцируемого комплекса 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 мРНК-мишенью одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень, индуцируя сайленсинг (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; в качестве альтернативы, выступающий конец может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или больше. Нуклеотидный выступающий конец может содержать аналог нуклеотида/нуклеозида, в том числе дезоксинуклеотид/нуклеозид, или состоять из него. Выступающий(выступающие) конец(концы) может(могут) находиться в смысловой нити, антисмысловой нити или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(нуклеотиды) выступающего конца может(могут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах антисмысловой либо 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 смысловой нити или антисмысловой нити или в них обеих может содержать удлиненные отрезки длиной более 10 нуклеотидов, например, длиной 10-30 нуклеотидов, 10-25 нуклеотидов, 10-20 нуклеотидов или 10-15 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец находится в смысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует на 3'-конце смысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует на 5'-конце смысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец находится в антисмысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует на 3'-конце антисмысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует на 5'-конце антисмысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления один или несколько нуклеотидов удлиненного выступающего конца заменены нуклеозидтиофосфатом.

Термины "тупой конец" или "с тупыми концами", используемые в данном документе в отношении dsRNA, означают, что на указанном терминальном конце dsRNA отсутствуют неспаренные нуклеотиды или аналоги нуклеотидов, т. е. отсутствует нуклеотидный выступающий конец. Один или оба конца dsRNA могут быть тупыми. Если оба конца dsRNA являются тупыми, то говорят, что данная dsRNA "с тупыми концами". Для внесения ясности, dsRNA "с тупыми концами" представляет собой dsRNA, у которой оба конца являются тупыми, т. е. ни на одном из концов молекулы нет нуклеотидного выступающего конца. Чаще всего такая молекула будет двунитевой по всей своей длине.

Термин "антисмысловая нить" или "направляющая нить" относится к нити iRNA, например, dsRNA, которая содержит участок, практически комплементарный последовательности-мишени, например, мРНК ANGPTL3. Используемый в данном документе термин "участок комплементарности" относится к участку в антисмысловой

нити, практически комплементарному последовательности, например, последовательности-мишени, например, нуклеотидной последовательности ANGPTL3, которая определена в данном документе. В тех случаях, когда участок комплементарности не полностью комплементарен последовательности-мишени, во внутренних или концевых участках молекулы могут присутствовать ошибки спаривания. Как правило, наиболее допустимые ошибки спаривания находятся в концевых участках, например, в пределах 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов 5'- и/или 3'-конца 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, которые находятся на любом из концов сайта расщепления и непосредственно прилегают к нему. В некоторых вариантах осуществления участок расщепления содержит два основания, которые находятся на любом из концов сайта расщепления и непосредственно прилегают к нему. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления, в частности, находится в сайте, ограниченном 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, в определенных условиях гибридизироваться и образовывать дуплексную структуру 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 в себя: 400 мМ NaCl, 40 мМ PIPES, pH 6,4, 1 мМ EDTA, 50°C или 70°C в течение 12-16 часов 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, 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 с сохранением при этом способности 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 односторонних выступающих концов, то такие выступающие концы не будут считаться ошибками спаривания применительно к определению комплементарности. Например, dsRNA, содержащая один олигонуклеотид длиной 21

нуклеотид и другой олигонуклеотид длиной 23 нуклеотида, где более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, может все равно называться "полностью комплементарной" для целей, описанных в данном документе.

"Комплементарные" последовательности, как используется в данном документе, могут также содержать пары оснований, образованные не по модели Уотсона-Крика, и/или пары оснований, образованные из неприродных и модифицированных нуклеотидов, или могут быть полностью образованы из них в такой степени, в которой выполняются вышеуказанные требования по отношению к их способности к гибридизации. Такие пары оснований, образованные не по модели Уотсона-Крика, включают в себя без ограничения неоднозначные G:U или хугстиновское спаривание 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 последовательностью-мишенью, как будет понятно из контекста их применения.

Как используется в данном документе, полинуклеотид, "практически комплементарный по меньшей мере части" матричной РНК (мРНК), относится к полинуклеотиду, практически комплементарному непрерывной части мРНК, представляющей интерес (например, мРНК, кодирующей ANGPTL3). Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части мРНК ANGPTL3, если последовательность практически комплементарна непрерывающейся части мРНК, кодирующей ANGPTL3.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления раскрытые в данном документе полинуклеотиды антисмысловой нити полностью комплементарны последовательности-мишени ANGPTL3. В других вариантах осуществления раскрытые в данном документе полинуклеотиды антисмысловой нити практически комплементарны последовательности-мишени ANGPTL3 и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% комплементарна по всей своей длине

эквивалентному участку нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или фрагмента SEQ ID NO: 1, как, 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 последовательности-мишени ANGPTL3, и при этом полинуклеотид смысловой нити содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентному участку нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5 или любого фрагмента SEQ ID NO: 5, как, 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%. Термин "ингибирование", используемый в данном документе, используют взаимозаменяемо со "снижением", "сайленсингом", "деактивацией", "подавлением" и другими подобными терминами, и он предусматривает любой уровень ингибирования.

Фраза "ингибирование экспрессии ANGPTL3", используемая в данном документе, включает ингибирование экспрессии любого гена ANGPTL3 (такого как, например, ген ANGPTL3 мыши, ген ANGPTL3 крысы, ген ANGPTL3 обезьяны или ген ANGPTL3 человека), а также вариантов или мутантных форм гена ANGPTL3, кодирующих белок ANGPTL3.

"Ингибирование экспрессии гена ANGPTL3" предусматривает любой уровень ингибирования гена ANGPTL3, например, по меньшей мере частичное подавление экспрессии гена ANGPTL3, как,

например, ингибирование по меньшей мере на приблизительно 20%. В определенных вариантах осуществления ингибирование происходит 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%.

Экспрессию гена ANGPTL3 можно оценивать на основании уровня любой переменной, связанной с экспрессией гена ANGPTL3, например, уровня мРНК ANGPTL3 или уровня белка ANGPTL3. Экспрессию ANGPTL3 также можно оценивать опосредованно на основании уровней липидов сыворотки крови, триглицеридов, холестерина (в том числе LDL-C, HDL-C, VLDL-C, IDL-C и общего холестерина) или свободных жирных кислот. Ингибирование можно оценивать по уменьшению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких из этих переменных по сравнению с контрольным уровнем. Контрольный уровень может представлять собой любой тип контрольного уровня, который используют в данной области техники, например, исходный уровень до приема дозы или уровень, определенный у сходных субъекта, клетки или образца, являющихся необработанными или обработанными контролем (таким как, например, контроль только с буфером или контроль с неактивным средством).

В одном варианте осуществления по меньшей мере частичное подавление экспрессии гена ANGPTL3 оценивают по снижению

количества мРНК ANGPTL3, которую можно выделить из первой клетки или группы клеток, в которых транскрибируется ген ANGPTL3 и которые были обработаны таким образом, что экспрессия гена ANGPTL3 ингибируется, или выявить в них, по сравнению со второй клеткой или группой клеток (контрольными клетками), практически идентичными первой клетке или группе клеток, но которые не были обработаны подобным образом. Степень ингибирования можно выразить в виде

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

Фраза "приведение клетки в контакт со средством для RNAi", таким как dsRNA, используемая в данном документе, включает приведение клетки в контакт любым возможным способом. Приведение клетки в контакт со средством для RNAi включает в себя приведение клетки в контакт с iRNA *in vitro* или приведение клетки в контакт с iRNA *in vivo*. Приведение в контакт можно осуществлять непосредственно или опосредованно. Таким образом, например, средство для RNAi может быть приведено в физический контакт с клеткой лицом, осуществляющим способ, или, в качестве альтернативы, средство для RNAi можно поместить в обстановку, которая обеспечит ему возможность впоследствии прийти в контакт с клеткой или послужит причиной этому.

Приведение клетки в контакт *in vitro* можно выполнять, например, путем инкубирования клетки со средством для RNAi. Приведение клетки в контакт *in vivo* можно выполнять, например, путем инъекции средства для RNAi в ткань, в которой находится клетка, или рядом с ней или путем инъекции средства для RNAi в другую область, например, кровоток или подкожное пространство, таким образом, что средство будет впоследствии достигать ткани, в которой находится клетка, которую необходимо привести в контакт. Например, средство для RNAi может содержать лиганд, например, GalNAc3, который направляет средство для RNAi к месту, представляющему интерес, например, к печени, и/или может быть связано с ним. Также возможны комбинации способов приведения в контакт *in vitro* и *in vivo*. Например, клетку также можно

приводить в контакт со средством для RNAi *in vitro* и впоследствии пересаживать субъекту.

В одном варианте осуществления приведение клетки в контакт с iRNA включает "введение" или "доставку iRNA в клетку" путем содействия поглощению или абсорбции в клетку или их осуществления. Абсорбция или поглощение iRNA может происходить посредством самостоятельных диффузионных или активных клеточных процессов или с помощью вспомогательных средств или устройств. Введение iRNA в клетку можно осуществлять *in vitro* и/или *in vivo*. Например, в случае введения *in vivo* iRNA можно вводить путем инъекции в участок ткани или вводить системно. Доставку *in vivo* также можно осуществлять с помощью бета-глюкановой системы доставки, такой как описанная в патентах США №№ 5032401 и 5607677 и публикации заявки на патент США № 2005/0281781, полное содержание которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки. Введение в клетку *in vitro* включает в себя известные из уровня техники способы, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны в данном документе ниже и/или известны из уровня техники.

Термин "липидная наночастица" или "LNP" означает пузырек, содержащий липидный слой, инкапсулирующий фармацевтически активную молекулу, такую как молекула нуклеиновой кислоты, например, iRNA или плазида, с которой транскрибируется iRNA. LNP описаны, например, в патентах США №№ 6858225, 6815432, 8158601 и 8058069, полное содержание которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Как используется в данном документе, "субъект" представляет собой животное, такое как млекопитающее, в том числе примат (такой как человек, отличный от человека примат, например, обезьяна и шимпанзе), отличное от примата млекопитающее (такое как корова, свинья, верблюд, лама, лошадь, коза, кролик, овца, хомяк, морская свинка, кошка, собака, крыса, мышь, лошадь и кит), или птица (например, утка или гусь). В варианте осуществления субъект представляет собой человека, такого как человек, подвергаемый лечению или оцениваемый в отношении заболевания, нарушения или состояния, на которое будет оказывать

благоприятное воздействие снижение экспрессии ANGPTL3; человек, подверженный риску возникновения заболевания, нарушения или состояния, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии ANGPTL3; человек, имеющий заболевание, нарушение или состояние, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии ANGPTL3; и/или человек, подвергаемый лечению заболевания, нарушения или состояния, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии ANGPTL3, как описано в данном документе.

Используемые в данном документе термины "осуществление лечения" или "лечение" относятся к благоприятному или желаемому результату, как, например, включающему в себя снижение уровней триглицеридов у субъекта. Термины "осуществление лечения" или "лечение" также включают без ограничения облегчение или уменьшение интенсивности одного или нескольких симптомов нарушения метаболизма липидов, такое как, например, уменьшение размера эруптивных ксантом. "Лечение" также может означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения.

Под "снижением" применительно к маркеру или симптому нарушения подразумевают статистически значимое уменьшение такого уровня. Уменьшение, например, может происходить по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40% или больше и предпочтительно до уровня, принятого как находящийся в пределах диапазона нормы для индивидуума без такого нарушения.

Как используется в данном документе, "предупреждение" или "осуществление предупреждения" при использовании в отношении заболевания, нарушения или состояния, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена ANGPTL3, относится к снижению вероятности того, что у субъекта разовьется симптом, ассоциированный с таким заболеванием, нарушением или состоянием, например, высокие уровни триглицеридов или эруптивная ксантома. Вероятность развития высоких уровней триглицеридов или эруптивной ксантомы снижается, например, если у индивидуума, имеющего один или несколько факторов риска

возникновения высоких уровней триглицеридов или эруптивной ксантомы, не способны развиться высокие уровни триглицеридов или эруптивная ксантома либо развиваются высокие уровни триглицеридов или эруптивная ксантома с меньшей степенью тяжести относительно популяции, имеющей те же факторы риска и не получающей лечение, описанное в данном документе. Неспособность к развитию 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 "липид сыворотки крови" относится к любому из основных липидов, присутствующих в крови. Липиды сыворотки крови могут присутствовать в крови в свободной форме либо в качестве части белкового комплекса, например, липопротеинового комплекса. Неограничивающие примеры липидов сыворотки крови могут включать в себя триглицериды и холестерин, такой как общий холестерин (TG), холестерин липопротеинов низкой плотности (LDL-C), холестерин липопротеинов высокой плотности (HDL-C), холестерин липопротеинов очень низкой плотности (VLDL-C) и холестерин липопротеинов промежуточной плотности (IDL-C).

Как используется в данном документе, "нарушение метаболизма липидов" относится к любому нарушению, ассоциированному с расстройством метаболизма липидов или вызываемому им. Например, данный термин включает любое нарушение, заболевание или состояние, которое может приводить к гиперлипидемии, или состояние, характеризующееся аномальным повышением уровней любого или всех липидов и/или липопротеинов в крови. Данный термин относится к наследственному нарушению, такому как семейная гипертриглицеридемия, семейная очаговая липодистрофия 1 типа (FPLD1), или индуцированному или приобретенному нарушению, такому как нарушение, индуцированное или приобретенное в результате заболевания, нарушения или состояния (например,

почечной недостаточности), влияния рациона питания или приема определенных лекарственных средств (например, в результате влияния высокоактивной антиретровирусной терапии (HAART), применяемой для лечения, например, AIDS или HIV). Иллюстративные нарушения метаболизма липидов включают без ограничения атеросклероз, дислипидемию, гипертриглицеридемию (в том числе гипертриглицеридемию, индуцированную лекарственными средствами, гипертриглицеридемию, индуцированную диуретиками, гипертриглицеридемию, индуцированную алкоголем, гипертриглицеридемию, индуцированную β -адреноблокаторами, гипертриглицеридемию, индуцированную эстрогенами, гипертриглицеридемию, индуцированную глюкокортикоидами, гипертриглицеридемию, индуцированную ретиноидами, гипертриглицеридемию, индуцированную циметидином, и семейную гипертриглицеридемию), острый панкреатит, ассоциированный с гипертриглицеридемией, хиломикронемический синдром, семейную хиломикронемию, дефицит Apo-E или резистентность к нему, дефицит или пониженную активность LPL, гиперлипидемию (в том числе семейную комбинированную гиперлипидемию), гиперхолестеринемию, подагру, ассоциированную с гиперхолестеринемией, ксантоматоз (подкожные отложения холестерина), гиперлипидемию с гетерогенным дефицитом LPL и гиперлипидемию с высоким уровнем LDL и гетерогенным дефицитом LPL.

Сердечно-сосудистые заболевания, ассоциированные с нарушениями метаболизма липидов, также считаются "нарушениями метаболизма липидов", определенными в данном документе. Эти заболевания могут включать в себя болезнь коронарных артерий (также называемую ишемической болезнью сердца), воспаление, ассоциированное с болезнью коронарных артерий, рестеноз, заболевания периферических сосудов и инсульт.

Нарушения, связанные с весом тела, также считаются "нарушениями метаболизма липидов", определенными в данном документе. Такие нарушения могут включать в себя ожирение, метаболический синдром, в том числе независимые компоненты метаболического синдрома (например, центральное ожирение,

FBG/преддиабет/диабет, гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемию и гипертензию), гипотиреоз, уремию и другие состояния, ассоциированные с набором веса (в том числе быстрый набор веса), потерю веса, поддержание потери веса или риск повторного набора веса после потери веса.

Нарушения уровня сахара в крови также считаются "нарушениями метаболизма липидов", определенными в данном документе. Такие нарушения могут включать в себя диабет, гипертензию и синдром поликистозных яичников, связанные с резистентностью к инсулину. Другие иллюстративные нарушения метаболизма липидов также могут включать в себя пересадку почки, нефротический синдром, синдром Кушинга, акромегалию, системную красную волчанку, дисглобулинемию, липодистрофию, гликогеноз I типа и болезнь Аддисона.

"Терапевтически эффективное количество", как используется в данном документе, подразумевается как включающее количество средства для RNAi, которое при введении субъекту, имеющему нарушение метаболизма липидов, является достаточным для осуществления лечения заболевания (например, путем ослабления, уменьшения интенсивности или поддержания существующего заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания). "Терапевтически эффективное количество" может варьироваться в зависимости от средства для RNAi, пути введения средства, заболевания и его степени тяжести и анамнеза, возраста, веса, семейного анамнеза, набора генов, типов предшествующего или сопутствующего лечения при наличии такового и других индивидуальных характеристик субъекта, который подлежит лечению.

"Профилактически эффективное количество", как используется в данном документе, подразумевается как включающее количество iRNA, которое при введении субъекту, имеющему нарушение метаболизма липидов, является достаточным для предупреждения или уменьшения интенсивности заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания. Уменьшение интенсивности заболевания включает замедление течения заболевания или снижение степени тяжести заболевания, развивающегося позже. "Профилактически эффективное количество" может варьироваться в зависимости от

iRNA, пути введения средства, степени риска возникновения заболевания, а также анамнеза, возраста, веса, семейного анамнеза, набора генов, типов предшествующего или сопутствующего лечения при наличии такового и других индивидуальных характеристик пациента, который подлежит лечению.

"Терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" также включает в себя количество средства для RNAi, которое обеспечивает некоторый желаемый локальный или системный эффект при приемлемом соотношении польза/риск, применимом к любому лечению. iRNA, используемые в способах согласно настоящему изобретению, можно вводить в количестве, достаточном для обеспечения приемлемого соотношения польза/риск, применимого к такому лечению.

Фраза "фармацевтически приемлемый" используется в данном документе для обозначения таких соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые по результатам тщательной медицинской оценки подходят для применения в контакте с тканями субъектов-людей и субъектов-животных без чрезмерных токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений в соответствии с приемлемым соотношением польза/риск.

Фраза "фармацевтически приемлемый носитель", используемая в данном документе, означает фармацевтически приемлемые материал, композицию или среду, как, например, жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, наполнитель, добавку для производства (например, смазывающее вещество, тальк, стеарат магния, кальция или цинка или стеариновую кислоту) или материал для инкапсулирования растворителя, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения от одного органа или части тела к другому органу или части тела. Каждый носитель должен быть "приемлемым" в том смысле, что он должен быть совместимым с другими ингредиентами состава и не наносить вред субъекту, подвергаемому лечению. Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают в себя: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) виды крахмала, такие как кукурузный

крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетилцеллюлоза; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) смазывающие средства, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк; (8) наполнители, такие как масло какао и суппозиторные воски; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апирогенную воду; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) буферные растворы с определенным pH; (21) сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; (22) объемообразующие средства, такие как полипептиды и аминокислоты; (23) компонент сыворотки крови, такой как сывороточный альбумин, HDL и LDL; и (22) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

Термин "образец", используемый в данном документе, включает совокупность сходных жидкостей, клеток или тканей, выделенных из организма субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают в себя кровь, сыворотку крови и серозные жидкости, плазму крови, спинномозговую жидкость, внутриглазные жидкости, лимфу, мочу, слюну и т. п. Образцы тканей могут включать в себя 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 можно получить из печени (например, всей печени, или определенных сегментов печени, или определенных типов клеток в печени, таких как, например, гепатоциты). В некоторых вариантах осуществления "'образец, полученный из организма субъекта'" относится к крови или плазме крови, взятым из организма субъекта.

II. iRNA по настоящему изобретению

В данном документе описаны iRNA, которые ингибируют экспрессию гена ANGPTL3. В одном варианте осуществления средство на основе iRNA включает в себя молекулы двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии гена ANGPTL3 в клетке, такой как клетка в организме субъекта, например, млекопитающего, такого как человек, имеющий нарушение метаболизма липидов, например, семейную гиперлипидемию. DsRNA содержит антисмысловую нить, имеющую участок комплементарности, комплементарный по меньшей мере части мРНК, образующейся при экспрессии гена ANGPTL3. Участок комплементарности имеет длину приблизительно 30 нуклеотидов или меньше (например, длину приблизительно 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19 или 18 нуклеотидов или меньше). При контакте с клеткой, экспрессирующей ген ANGPTL3, iRNA ингибирует экспрессию гена ANGPTL3 (например, гена ANGPTL3 человека, примата, отличного от примата млекопитающего или птицы) по меньшей мере на приблизительно 10%, что установлено путем анализа, например, с помощью ПЦР или способа с использованием разветвленной ДНК (bDNA) или с помощью способа на основе анализа белков, как, например, с помощью иммунофлуоресцентного анализа с применением, например, методик вестерн-блоттинга или проточной цитометрии.

dsRNA содержит две нити РНК, которые являются комплементарными и гибридизируются с образованием дуплексной структуры при условиях, в которых dsRNA будет применяться. Одна нить dsRNA (антисмысловая нить) содержит участок комплементарности, который практически комплементарен и обычно полностью комплементарен последовательности-мишени. Последовательность-мишень можно получить из последовательности мРНК, образующейся в процессе экспрессии гена ANGPTL3. 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 других местах в данном документе и как известно из уровня техники, комплементарные последовательности dsRNA также могут содержаться в виде самокомплементарных

участков одной молекулы нуклеиновой кислоты, а не располагаться в отдельных олигонуклеотидах.

Как правило, дуплексная структура имеет длину от 15 до 30 пар оснований, например, имеет длину 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.

Аналогично, участок комплементарности по отношению к последовательности-мишени имеет длину от 15 до 30 нуклеотидов, например, имеет длину 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 dsRNA имеет длину от приблизительно 15 до приблизительно 23 нуклеотидов или от приблизительно 25 до приблизительно 30 нуклеотидов. Как правило, dsRNA является достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для фермента Dicer. Например, как хорошо известно из уровня техники, dsRNA, имеющие длину более чем приблизительно 21-23 нуклеотида, могут служить в качестве субстратов для Dicer. Также среднему специалисту в данной области будет понятно, что участок РНК, на который нацелено расщепление, чаще всего будет частью более крупной молекулы РНК, зачастую молекулы мРНК. В соответствующих случаях "частью" мРНК-мишени является

непрерывная последовательность мРНК-мишени, имеющая длину, достаточную для того, чтобы позволить ей быть субстратом для управляемого RNAi 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, 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 желаемую 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 не является встречающейся в природе miRNA. В другом варианте осуществления средство на основе iRNA, применимое для целенаправленного воздействия на экспрессию ANGPTL3, не образуется в клетке-мишени путем расщепления более крупной dsRNA.

Описанная в данном документе dsRNA может дополнительно содержать один или несколько односторонних нуклеотидных выступающих концов, например, из 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов. dsRNA, имеющие по меньшей мере один нуклеотидный выступающий

конец, могут обладать 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 смысловой нити, антисмысловой нити или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(нуклеотиды) выступающего конца может(могут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах антисмысловой либо смысловой нити dsRNA.

dsRNA можно синтезировать с помощью стандартных способов, известных из уровня техники и 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 отдельно. 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 неприродные 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. Последовательность смысловой нити выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из таблиц 2А, 2В, 4А, 4В, 5, 7А, 7В, 7С, 8А, 8В, 10А, 10В, 13А, 13В, 14, 15А и 15В, и соответствующая смысловой нити нуклеотидная последовательность антисмысловой нити выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из таблиц 2А, 2В, 4А, 4В, 5, 7А, 7В, 7С, 8А, 8В, 10А, 10В, 13А, 13В, 14, 15А и

15В. 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 ANGPTL3. В связи с этим в данном аспекте dsRNA будет содержать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описан как смысловая нить (сопровождающая нить) в любой из таблиц 2А, 2В, 4А, 4В, 5, 7А, 7В, 7С, 8А, 8В, 10А, 10В, 13А, 13В, 14, 15А и 15В, а второй олигонуклеотид описан как соответствующая смысловой нити антисмысловая нить (направляющая нить) в какой-либо из таблиц 2А, 2В, 4А, 4В, 5, 7А, 7В, 7С, 8А, 8В, 10А, 10В, 13А, 13В, 14, 15А и 15В. 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 последовательности в таблицах 2А, 2В, 4А, 4В, 5, 7А, 7В, 7С, 8А, 8В, 10А, 10В, 13А, 13В, 14, 15А и 15В описаны как модифицированные, немодифицированные, неконъюгированные и/или конъюгированные последовательности, РНК из числа iRNA по настоящему изобретению, например, dsRNA по настоящему изобретению, может содержать любую из последовательностей, изложенных в любой из таблиц 2А, 2В, 4А, 4В, 5, 7А, 7В, 7С, 8А, 8В, 10А, 10В, 13А, 13В, 14, 15А и 15В, которая является немодифицированной, неконъюгированной и/или модифицированной и/или конъюгированной иным образом, нежели описано в них.

В другом аспекте двухнитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA) по настоящему изобретению для ингибирования экспрессии ANGPTL3 содержит смысловую нить и антисмысловую нить, состоит главным образом из них или состоит из них, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-usgsucacUfuGfAfAfcusaacusaal96-3', а антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-asusUfsgagUfuGfAfguucAfaGfugacasusa-3'; или смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-

gsasauauGfuCfAfCfuugaacucuaaL96-3', а антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность usUfsgagUfuCfAfagugAfcAfuaauucsusu.

Специалисту в данной области хорошо известно, что dsRNA, имеющие дуплексную структуру из приблизительно 20-23 пар оснований, например, из 21 пары оснований, были расценены как особенно эффективные в индукции РНК-интерференции (Elbashir *et al.*, (2001) *EMBO J.*, 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 вариантах осуществления, описанных выше, в соответствии с природой олигонуклеотидных последовательностей, предусмотренных в данном документе, dsRNA, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере одну нить длиной как минимум 21 нуклеотид. С достаточной вероятностью можно предполагать, что более короткие дуплексы, лишенные лишь нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, могут обладать аналогичной эффективностью по сравнению с dsRNA, описанными выше. Следовательно, в объеме настоящего изобретения предусматриваются dsRNA, имеющие последовательность по меньшей мере из 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей, предусмотренных в данном документе, и отличающиеся по своей способности ингибировать экспрессию гена ANGPTL3 не более чем на приблизительно 5, 10, 15, 20, 25 или 30% ингибирования от dsRNA, содержащей полную последовательность.

В дополнение, РНК, описанные в данном документе, идентифицируют сайт(сайты) в транскрипте ANGPTL3, которые восприимчивы к RISC-опосредованному расщеплению. Таким образом, в настоящем изобретении дополнительно представлены iRNA, которые осуществляют целенаправленное воздействие в пределах этого(этих) сайта(сайтов). Как используется в данном документе, говорят, что iRNA осуществляет целенаправленное воздействие в пределах конкретного сайта РНК-транскрипта, если iRNA способствует расщеплению транскрипта в любом месте в пределах этого конкретного сайта. Такая iRNA будет, как правило, содержать по

меньшей мере приблизительно 15 смежных нуклеотидов из одной из последовательностей, предусмотренных в данном документе, соединенных с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из участка, смежного с выбранной последовательностью в гене ANGPTL3.

При том, что целевая последовательность, как правило, имеет длину приблизительно 15-30 нуклеотидов, существует широкий спектр пригодности конкретных последовательностей в этом диапазоне для управления расщеплением любой указанной РНК-мишени. В различных пакетах программного обеспечения и методических руководствах, изложенных в данном документе, представлены принципы идентификации оптимальных целевых последовательностей для любого указанного гена-мишени, но также можно принять эмпирический подход, в котором "окно" или "маска" указанного 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 от исходного местоположения целевой последовательности, можно идентифицировать следующую потенциальную целевую последовательность, пока не будет идентифицирован полный набор возможных последовательностей для любого указанного 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 из уровня техники) для идентификации последовательностей с оптимальными характеристиками можно идентифицировать те последовательности РНК, которые при целенаправленном воздействии со средством на основе *iRNA* опосредуют наилучшее ингибирование экспрессии гена-мишени. Таким образом, при том, что последовательности, идентифицированные в данном документе, представляют собой эффективные целевые последовательности, предполагается, что дополнительной оптимизации эффективности ингибирования можно достичь путем

постепенного "передвижения окна" на один нуклеотид выше или ниже относительно указанных последовательностей для идентификации последовательностей с такими же или лучшими характеристиками ингибирования.

Дополнительно предполагается, что для любой последовательности, идентифицированной в данном документе, дополнительной оптимизации можно достичь путем систематического добавления либо удаления нуклеотидов с получением более длинных или более коротких последовательностей и тестирования таких последовательностей, полученных путем передвижения окна более длинного или более короткого размера выше или ниже относительно целевой РНК в данной точке. Также результатом объединения этого подхода для получения новых целевых последовательностей-кандидатов и тестирования эффективности iRNA на основе этих целевых последовательностей в анализе ингибирования, известном из уровня техники или описанном в данном документе, могут быть дополнительные улучшения в эффективности ингибирования. Более того, такие оптимизированные последовательности можно корректировать посредством, например, введения модифицированных нуклеотидов, описанных в данном документе или известных из уровня техники, добавления или изменения выступающего конца или других модификаций, известных из уровня техники и/или обсуждаемых в данном документе, для дальнейшей оптимизации молекулы (например, увеличения стабильности в сыворотке крови или периода полувыведения из кровотока, увеличения термостабильности, повышения точности трансмембранной доставки, нацеливания на конкретное местоположение или тип клетки, увеличения интенсивности взаимодействия с ферментами пути сайленсинга, увеличения высвобождения из эндосом) в качестве ингибитора экспрессии.

Средство на основе iRNA, описанное в данном документе, может содержать одну или несколько ошибок спаривания с последовательностью-мишенью. В одном варианте осуществления iRNA, описанная в данном документе, содержит не более 3 ошибок спаривания. Если антисмысловая нить iRNA содержит ошибки спаривания с последовательностью-мишенью, предпочтительно, чтобы

область ошибочного спаривания находилась не в центре участка комплементарности. Если антисмысловая нить iRNA содержит ошибки спаривания с последовательностью-мишенью, предпочтительно, чтобы ошибка спаривания была ограничена нахождением в пределах последних 5 нуклеотидов от 5'- либо от 3'-конца участка комплементарности. Например, в случае средства на основе iRNA из 23 нуклеотидов нить, комплементарная участку гена ANGPTL3, 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 последовательностью-мишенью, эффективной в ингибировании экспрессии гена ANGPTL3. Рассмотрение эффективности iRNA с ошибками спаривания в ингибировании экспрессии гена ANGPTL3 является важным, особенно если известно, что конкретный участок комплементарности в гене ANGPTL3 характеризуется полиморфной изменчивостью последовательности 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 из уровня техники и описанные в данном документе. В другом варианте осуществления РНК из числа iRNA по настоящему изобретению, например, dsRNA, является химически модифицированной с целью повышения стабильности или других благоприятных характеристик. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения практически все из нуклеотидов iRNA по настоящему изобретению являются модифицированными. В других вариантах осуществления настоящего изобретения 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.

Нуклеиновые кислоты, представленные в настоящем изобретении, могут быть синтезированы и/или модифицированы с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, таких как описанные в "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, который настоящим включен в данный документ посредством ссылки. Модификации включают в себя, 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 пары оснований с расширенным репертуаром партнеров, удаление оснований (лишенные азотистого основания нуклеотиды) или конъюгированные основания; модификации сахарных фрагментов (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замену сахарного фрагмента; и/или модификации остова, в том числе модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры соединений на основе iRNA, применимых в описанных в данном документе вариантах осуществления, включают без ограничения РНК, содержащие модифицированные остовы или неприродные межнуклеозидные связи. РНК, имеющие модифицированные остовы, включают в себя, среди прочего, РНК, которые не содержат атом фосфора в остове. Для целей данного описания, и как иногда упоминается в уровне техники, модифицированные РНК, не имеющие атом фосфора в своем межнуклеозидном остове, также могут считаться олигонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления модифицированная iRNA будет иметь атом фосфора в своем межнуклеозидном остове.

Модифицированные остовы РНК включают в себя, например, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфородитиоаты, сложные фосфотриэфиры, сложные аминокилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, в том числе 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, в том числе 3'-аминофосфорамидат и аминокилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, сложные тионоалкилфосфотриэфиры и

боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5'-связи, их аналоги, имеющие 2'-5'-связи, а также таковые, имеющие инвертированную полярность, где соседние пары нуклеозидных звеньев соединены 3'-5' к 5'-3' или 2'-5' к 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты.

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения вышеуказанных фосфоросодержащих связей, включают в себя без ограничения патенты США №№ 3687808; 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; 7321029 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, имеющие морфолиновые связи (частично образованные из сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы; алкенсодержащие остовы; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленигидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы и другие, имеющие смесь составляющих частей N, O, S и CH₂.

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения вышеуказанных олигонуклеозидов, включают в себя без

ограничения патенты США №№ 5034506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,64,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 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 сахарный фрагмент, так и межнуклеозидная связь, т. е. остов, нуклеотидных звеньев заменены новыми группами. Звенья в виде оснований сохраняются для гибридизации с соответствующим соединением-мишенью 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, аминоэтилглициновым остовом. Нуклеотидные основания сохраняются и связываются непосредственно или опосредованно с атомами азота азатрупы амидной части остова. Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения соединений PNA, включают без ограничения 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, предусматривают РНК с фосфотиоатными остовами и олигонуклеозиды с гетероатомными остовами и, в частности, --CH₂--NH--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂-- [известный как метилен (метиляминовый) или MMI-остов], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- и --N(CH₃)--CH₂--CH₂-- [где нативный фосфодиэфирный остов представлен как --O--P--O--CH₂--] 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. *i*RNA, например, *ds*RNA, 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 C₁-C₁₀алкилом или C₂-C₁₀алкенилом и алкинилом. Иллюстративные подходящие модификации включают в себя O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ и O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, где n и m составляют от 1 до приблизительно 10. В других вариантах осуществления *ds*RNA содержат одно из следующего в 2'-положении: низший C₁-C₁₀алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминокламино, полиалкламино, замещенный силил, группу, расщепляющую РНК, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств *i*RNA или группу для улучшения фармакодинамических свойств *i*RNA и другие заместители с аналогичными свойствами. В некоторых вариантах осуществления модификация включает в себя 2'-метоксиэтокси (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-MOE) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), т. е. алкокси-алкоксигруппу. Другой иллюстративной модификацией является 2'-диметиламинооксиэтокси, т. е. группа O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, также известная как 2'-DMAOE, описанная в примерах в данном документе ниже, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известная из уровня техники как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), т. е. 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂. Дополнительные иллюстративные модификации включают в себя 5'-Me-2'-F-модифицированные нуклеотиды, 5'-Me-2'-OMe-модифицированные нуклеотиды, 5'-Me-2'-дезоксинуклеотиды (как R-, так и S-изомеры в этих трех семействах); 2'-алкоксиалкил и 2'-NMA (N-метилацетамид).

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH₃), 2'-

аминопропокси ($2'-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) и 2'-фтор ($2'-\text{F}$). Подобные модификации также могут быть осуществлены в других положениях в РНК из числа iRNA, в частности, в 3'-положении сахарного фрагмента в 3'-концевом нуклеотиде или в dsRNA с 2'-5'-связями и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. iRNA также могут иметь миметики сахарных фрагментов, такие как циклобутильные фрагменты, вместо пентофуранозильного сахарного фрагмента. Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения таких модифицированных сахарных структур, включают без ограничения патенты США №№ 4981957; 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 5700920, некоторые из которых имеют общего заявителя с настоящей заявкой. Полное содержание каждого из вышеупомянутых источников настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

iRNA по настоящему изобретению также может содержать модификации или замены нуклеотидного основания (часто называемого в данной области техники просто "основанием"). Как используется в данном документе, "немодифицированные" или "природные" нуклеотидные основания включают в себя 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 5-метилцитозин (5-Me-C), 5-гидроксиметилцитозин, 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-

дезазагуанин и 7-дезазааденин, а также 3-дезазагуанин и 3-дезазааденин. Дополнительные нуклеотидные основания включают в себя раскрытые в патенте США № 3687808, раскрытые в *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; раскрытые в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, раскрытые в *Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613, и раскрытые 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 увеличения сродства связывания олигомерных соединений, представленных в настоящем изобретении. Они включают в себя 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2-, N-6- и O-6-замещенные пурины, в том числе 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что 5-метилцитозиновые замещения увеличивают 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'-O-метоксиэтиловыми модификациями сахарных фрагментов.

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 №№ 3687808; 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 7495088, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

iRNA по настоящему изобретению также может быть модифицирована таким образом, чтобы содержать одну или несколько запертых нуклеиновых кислот (LNA). Запертая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, имеющий модифицированный рибозный фрагмент, где рибозный фрагмент содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-атомы углерода. Эта структура эффективно "запирает" рибозу в структурной 3'-эндо-конформации. Было показано, что добавление запертых нуклеиновых кислот в siRNA увеличивает стабильность siRNA в сыворотке крови и уменьшает нецелевые эффекты (Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. et al., (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193).

iRNA по настоящему изобретению также может быть модифицирована таким образом, чтобы содержать один или несколько бициклических сахарных фрагментов. "Бициклический сахарный фрагмент" представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное посредством связывания мостиком двух атомов. "Бициклический нуклеозид" ("BNA") представляет собой нуклеозид, имеющий сахарный фрагмент, содержащий мостик, соединяющий два атома углерода сахарного кольца, за счет чего осуществляется образование бициклической кольцевой системы. В определенных вариантах осуществления мостик соединяет 4'-атом углерода и 2'-атом углерода в сахарном кольце. Таким образом, в определенных вариантах осуществления средство по настоящему изобретению может содержать одну или несколько запертых нуклеиновых кислот (LNA). Запертая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, имеющий модифицированный рибозный фрагмент, где рибозный фрагмент содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-атомы углерода. Другими словами, LNA представляет собой нуклеотид, содержащий бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH₂-O-2'. Эта структура эффективно "запирает" рибозу в структурной 3'-эндо-конформации. Было показано, что добавление запертых нуклеиновых кислот в siRNA увеличивает стабильность siRNA в сыворотке крови и уменьшает нецелевые эффекты (Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids*

Research 33(1):439-447; Mook, OR. et al., (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). Примеры бициклических нуклеозидов для применения в полинуклеотидах по настоящему изобретению включают в себя 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 в себя без ограничения 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (также называемый "конформационно затрудненным этилом" или "cEt") и 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 7399845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278283); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278425); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (см., например, публикацию заявки на патент США № 2004/0171570); 4'-CH₂-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C₁-C₁₂алкил или защитную группу (см., например, патент США № 7427672); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (см., например, Chattopadhyaya et al., *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); и 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278426). Полное содержание каждого из вышеупомянутых источников настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Дополнительные иллюстративные патенты США и публикации заявок на патенты США, в которых изложена идея получения нуклеотидов по типу запертых нуклеиновых кислот, включают в себя без ограничения следующие: патенты США №№ 6268490; 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 имеющим одну или несколько стереохимических

конфигураций сахарного фрагмента, в том числе, например, α -L-рибофуранозу и β -D-рибофуранозу (см. WO 99/14226).

iRNA по настоящему изобретению также может быть модифицирована таким образом, чтобы содержать один или несколько конформационно затрудненных этилом нуклеотидов. Как используется в данном документе, "конформационно затрудненный этилом нуклеотид" или "cEt" представляет собой запертую нуклеиновую кислоту, содержащую бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH(CH₃)-O-2'. В одном варианте осуществления конформационно 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 увеличивает сродство гибридизации с мРНК. Линкер имеет достаточную длину для помещения атома кислорода в оптимальное для стабильности и сродства положение, что приводит в результате к меньшему "сморщиванию" рибозного кольца.

Иллюстративные публикации, в которых изложена идея получения некоторых из вышеуказанных CRN, включают в себя без ограничения публикацию заявки на патент США № 2013/0190383 и РСТ-публикацию WO 2013/036868, полное содержание каждой из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления iRNA по настоящему изобретению содержит один или несколько мономеров, которые представляют собой нуклеотиды по типу UNA (незапертых нуклеиновых кислот). UNA представляет собой незапертую ациклическую нуклеиновую кислоту, в которой какая-либо из связей в сахарном фрагменте была удалена с образованием незапертого "сахарного" остатка. В одном примере UNA также охватывает мономер, у которого были удалены связи C1'-C4' (т. е. ковалентная углерод-кислород-углеродная связь между атомами углерода C1' и C4'). В другом примере связь C2'-C3' (т. е.

ковалентная углерод-углеродная связь между атомами углерода C2' и C3') в сахарном фрагменте была удалена (см. *Nuc. Acids Symp. Series*, 52, 133-134 (2008) и Fluiter et al., *Mol. Biosyst.*, 2009, 10, 1039, настоящим включенные посредством ссылки).

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

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

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

IV. iRNA, конъюгированные с лигандами

Другая модификация РНК из числа iRNA по настоящему изобретению включает химическое связывание РНК с одним или несколькими лигандами, фрагментами или конъюгатами, которые повышают активность, распределение в клетках или поглощение клетками iRNA. Такие фрагменты включают без ограничения липидные фрагменты, такие как холестеринный фрагмент (Letsinger et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 6553-6556), холевая кислота (Manoharan et al., (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 4:1053-1060), тиоэфир, например, берил-S-третилтиол (Manoharan et al., (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660:306-309; Manoharan et

al., (1993) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 3:2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser *et al.*, (1992) *Nucl. Acids Res.*, 20:533-538), алифатическая цепь, например, додекандиоловые или ундециловые остатки (Saison-Behmoaras *et al.*, (1991) *EMBO J*, 10:1111-1118; Kabanov *et al.*, (1990) *FEBS Lett.*, 259:327-330; Svinarchuk *et al.*, (1993) *Biochimie*, 75:49-54), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-фосфонат триэтиламмония (Manoharan *et al.*, (1995) *Tetrahedron Lett.*, 36:3651-3654; Shea *et al.*, (1990) *Nucl. Acids Res.*, 18:3777-3783), полиаминная или полиэтиленгликолевая цепь (Manoharan *et al.*, (1995) *Nucleosides & Nucleotides*, 14:969-973) или адамантануксусная кислота (Manoharan *et al.*, (1995) *Tetrahedron Lett.*, 36:3651-3654), пальмитиловый фрагмент (Mishra *et al.*, (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, 1264:229-237) или октадециламиновый или гексиламинокарбонилкоксхолестериновый фрагмент (Crooke *et al.*, (1996) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277:923-937).

В одном варианте осуществления лиганд изменяет распределение, целенаправленное воздействие или время действия средства на основе *i*rNA, в состав которого он включен. В предпочтительных вариантах осуществления лиганд обеспечивает повышенное сродство к выбранной мишени, например, молекуле, клетке или типу клеток, компартменту, например, компартменту клетки или органа, ткани, органу или участку тела, например, по сравнению с молекулами, у которых отсутствует такой лиганд. Предпочтительные лиганды не будут принимать участие в образовании пар дуплекса в дуплексной нуклеиновой кислоте.

Лиганды могут включать в себя вещество, встречающееся в природе, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопроtein низкой плотности (LDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин, N-ацетилглюкозамин, 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

в себя полиаминокислоту, представляющую собой полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер L-лактида и гликолида, сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламида (HMPA), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), полимеры N-изопропилакриламида или полифосфазин. Примеры полиаминов включают полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, полиаминовый псевдопептид, полиаминовый пептидомиметик, полиаминовый дендример, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или альфа-спиральный пептид.

Лиганды также могут содержать нацеливающие группы, например, средство, нацеливающее на клетку или ткань, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, как, например, с клеткой почки. Нацеливающая группа может представлять собой тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, углевод муцин, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин B12, витамин А, биотин или RGD-пептид или миметик RGD-пептида.

Другие примеры лигандов включают в себя красители, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О-(гексадецил) глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол,

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

Лиганды могут представлять собой белки, например, гликопротеины, или пептиды, например, молекулы, обладающие специфическим сродством в отношении коллиганда, или антитела, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, как, например, с клеткой печени. Лиганды также могут включать в себя гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать в себя молекулы, отличные от пептидов, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза или поливалентная фукоза. Например, лиганд может представлять собой липополисахарид, активатор MAP-киназы p38 или активатор NF-κB.

Лиганд может представлять собой 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. Лекарственное средство может представлять собой, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

В некоторых вариантах осуществления лиганд, присоединенный к iRNA, описанной в данном документе, действует в качестве

модулятора фармакокинетических свойств (РК-модулятора). РК-модуляторы включают в себя липофильные вещества, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, белок-связывающие средства, PEG, витамины и т. д. Иллюстративные РК-модуляторы включают в себя без ограничения холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т. д. Олигонуклеотиды, которые содержат ряд фосфотиоатных 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 несколько фосфотиоатных связей в остоле, также пригодны в настоящем изобретении в качестве лигандов (например, в качестве РК-модулирующих лигандов). В дополнение, аптамеры, которые связываются с компонентами сыворотки крови (например, сывороточными белками), также пригодны для применения в качестве РК-модулирующих лигандов в описанных в данном документе вариантах осуществления.

Олигонуклеотиды, конъюгированные с лигандами, по настоящему изобретению можно синтезировать с применением олигонуклеотида, который несет боковую реакционноспособную функциональную группу, такого как полученный в результате присоединения связывающей молекулы к олигонуклеотиду (описано ниже). Этот реакционноспособный олигонуклеотид может непосредственно вступать в реакцию с коммерчески доступными лигандами, лигандами, синтезированными таким образом, что они несут какую-либо из разнообразных защитных групп, или лигандами, которые имеют связывающий фрагмент, присоединенный к ним.

Олигонуклеотиды, применяемые в конъюгатах по настоящему изобретению, можно получать удобным и обычным образом с помощью хорошо известной методики твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза продается несколькими фирмами-изготовителями, в том числе, например, Applied Biosystems (Фостер Сити, Калифорния). Дополнительно или в качестве альтернативы можно использовать любые другие средства для такого синтеза, известные

из уровня техники. Также известно применение аналогичных методик для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфотиоаты и алкилированные производные.

В олигонуклеотидах, конъюгированных с лигандом, и несущих молекулу лиганда специфичных в отношении последовательности связанных нуклеозидах по настоящему изобретению олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем синтезаторе ДНК с применением стандартных предшественников нуклеотидов или нуклеозидов или предшественников конъюгатов нуклеотидов или нуклеозидов, которые уже несут связывающий фрагмент, предшественников конъюгатов нуклеотид-лиганд или конъюгатов нуклеозидов, которые уже несут молекулу лиганда, или ненуклеозидных структурных блоков, несущих лиганд.

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

А. Липидные конъюгаты

В одном варианте осуществления лиганд или конъюгат представляет собой липидную молекулу или молекулу на основе липида. Такая липидная молекула или молекула на основе липида предпочтительно связывается с сывороточным белком, например, сывороточным альбумином человека (HSA). Связывающийся с HSA лиганд обеспечивает распределение конъюгата в ткани-мишени, например, в отличной от ткани почек ткани-мишени организма. Например, ткань-мишень может представлять собой печень, в том числе паренхиматозные клетки печени. Также в качестве лигандов можно применять другие молекулы, которые могут связываться с

HSA. Например, можно применять непростин или аспирин. Липидный лиганд или лиганд на основе липида может (а) увеличивать устойчивость к разрушению конъюгата, (b) увеличивать точность нацеливания или транспорт в клетку-мишень или мембрану клетки-мишени и/или (с) может применяться для корректировки связывания с сывороточным белком, например, HSA.

Лиганд на основе липида можно применять для ингибирования, например, регулирования связывания конъюгата с тканью-мишенью. 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 сильно связывается с HSA, можно применять для нацеливания конъюгата на почки.

В предпочтительном варианте осуществления лиганд на основе липида связывается с HSA. Он предпочтительно связывается с HSA со сродством, достаточным для того, чтобы конъюгат предпочтительно распределялся в ткани, отличной от ткани почек. Однако предпочтительно, чтобы сродство не было настолько сильным, 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 почке. Другие фрагменты, которые нацеливаются на клетки почки, также можно применять вместо лиганда на основе липида или в дополнение к нему.

В другом аспекте лиганд представляет собой фрагмент, например, витамин, который поглощается клеткой-мишенью, 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 в себя витамины А, Е и К. Другие иллюстративные витамины включают в себя витамины группы В, например, фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль, или другие витамины или питательные вещества,

поглощаемые клетками-мишенями, такими как клетки печени. Также включены HSA и липопротеин низкой плотности (LDL).

В. Средства, проникающие в клетку

В другом аспекте лиганд представляет собой средство, проникающее в клетку, предпочтительно спиральное средство, проникающее в клетку. Средство предпочтительно является амфипатическим. Иллюстративное средство представляет собой пептид, такой как tat или antennopodia. Если средство представляет собой пептид, то оно может быть модифицированным, в том числе с применением пептидных миметиков, инвертомеров, непептидных или псевдопептидных связей, а также D-аминокислот. Спиральное средство предпочтительно представляет собой альфа-спиральное средство, которое предпочтительно имеет липофильную и липофобную фазы.

Лиганд может представлять собой пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в данном документе олигопептидомиметиком) представляет собой молекулу, способную укладываться в определенную трехмерную структуру, аналогичную природному пептиду. Прикрепление пептида и пептидомиметиков к средствам на основе iRNA может повлиять на фармакокинетическое распределение iRNA, как, например, путем повышения точности распознавания и абсорбции клетками. Пептидный или пептидомиметический фрагмент может иметь длину приблизительно 5-50 аминокислот, например, приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

Пептид или пептидомиметик может представлять собой, например, пептид, проникающий в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий главным образом из Tyr, Trp или Phe). Пептидный фрагмент может представлять собой пептидный дендример, конформационно затрудненный пептид или сшитый пептид. В другом альтернативном варианте пептидный фрагмент может содержать гидрофобную последовательность, обеспечивающую перенос через мембрану (MTS). Иллюстративным пептидом, содержащим гидрофобную MTS, является RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 13). Аналог RFGF (например,

аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 10), содержащий гидрофобную MTS, также может являться нацеливающим фрагментом. Пептидный фрагмент может представлять собой доставляющий пептид, который может переносить крупные полярные молекулы, в том числе пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны. Например, было обнаружено, что последовательности из Tat-белка HIV (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 11) и белка Antennapedia дрозифилы (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 12) способны функционировать в качестве доставляющих пептидов. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться случайными последовательностями ДНК, как, например, пептид, идентифицированный из фаг-дисплейной библиотеки или комбинаторной библиотеки "одна гранула-одно соединение" (OBOC) (Lam *et al.*, Nature, 354:82-84, 1991). Примером пептида или пептидомиметика, связанного со средством на основе dsRNA посредством введенного мономерного звена для нацеливания на клетку, является пептид аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD) или имитатор RGD. Длина пептидного фрагмента может находиться в диапазоне от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут иметь структурную модификацию, как, например, для увеличения 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 содействия нацеливанию на конкретную (конкретные) ткань (ткани). Пептиды и пептидомиметики, содержащие RGD, могут включать в себя D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD, можно применять другие фрагменты, которые нацеливают лиганд интегрина. Предпочтительные конъюгаты такого лиганда нацелены на PECAM-1 или VEGF.

"Пептид, проникающий в клетку" способен проникать в клетку, например, в микробную клетку, такую как бактериальная или грибная клетка, или в клетку млекопитающего, такую как клетка

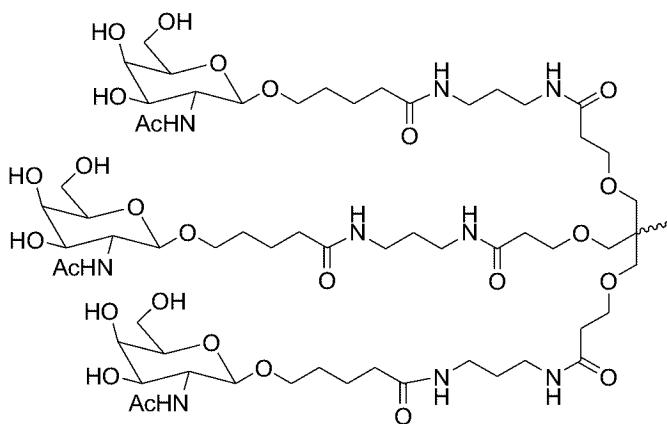
человека. Пептид, проникающий в микробную клетку, может представлять собой, например, α -спиральный линейный пептид (например, LL-37 или цекропин P1), пептид, содержащий дисульфидную связь (например, α -дефензин, β -дефензин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две преобладающие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Пептид, проникающий в клетку, также может содержать сигнал внутриядерной локализации (NLS). Например, пептид, проникающий в клетку, может представлять собой 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. Углеводные конъюгаты

В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению олигонуклеотид iRNA дополнительно содержит углевод. Конъюгированная с углеводом iRNA является преимущественной для доставки нуклеиновых кислот *in vivo*, а также для композиций, подходящих для терапевтического применения *in vivo*, описанного в данном документе. Как используется в данном документе, "углевод" относится к соединению, которое представляет собой углевод как таковой, 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. Иллюстративные углеводы включают в себя сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие от приблизительно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных звеньев) и полисахариды, такие как виды крахмала, гликоген, целлюлоза и полисахаридные смолы. Конкретные моносахариды включают в себя сахара C5 и выше (например, C5, C6,

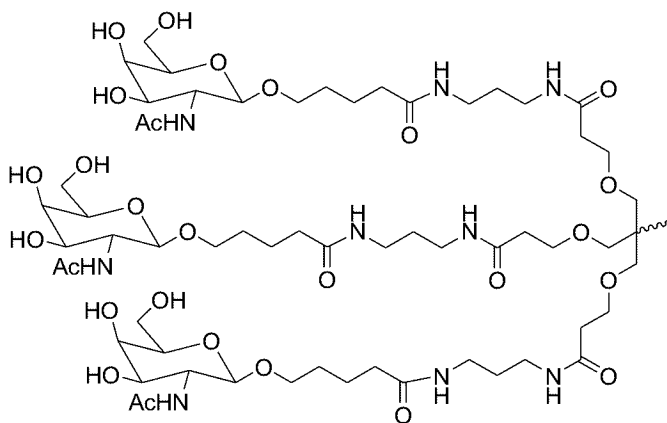
С7 или С8); ди- и трисахариды включают в себя сахара с двумя или тремя моносахаридными звеньями (например, С5, С6, С7 или С8).

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

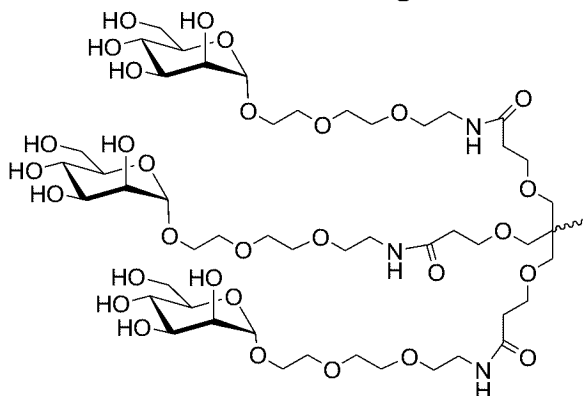


Формула II.

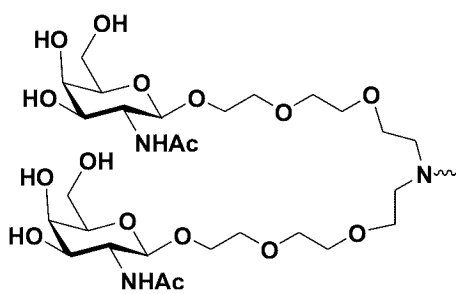
В другом варианте осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах по настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из:



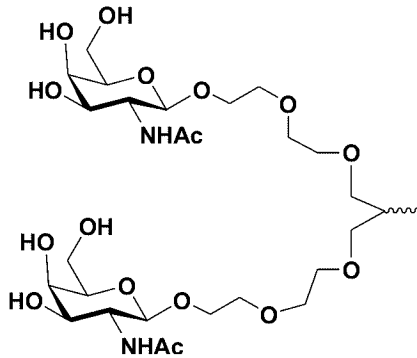
Формула II,



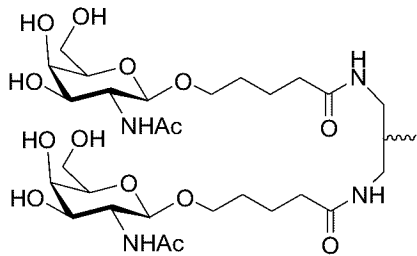
Формула III,



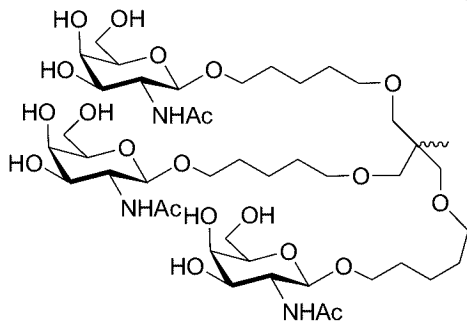
Формула IV,



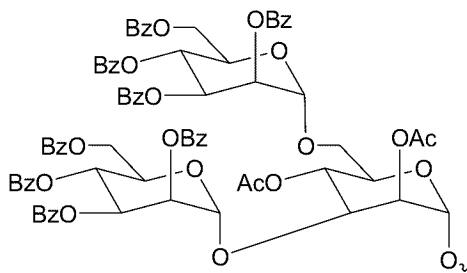
Формула V,



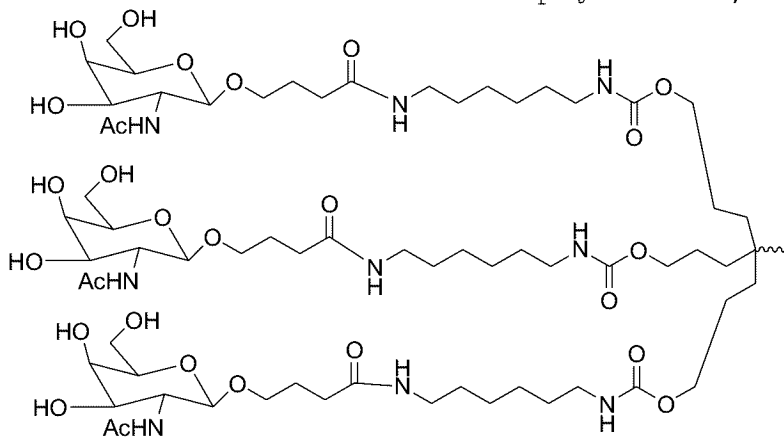
Формула VI,



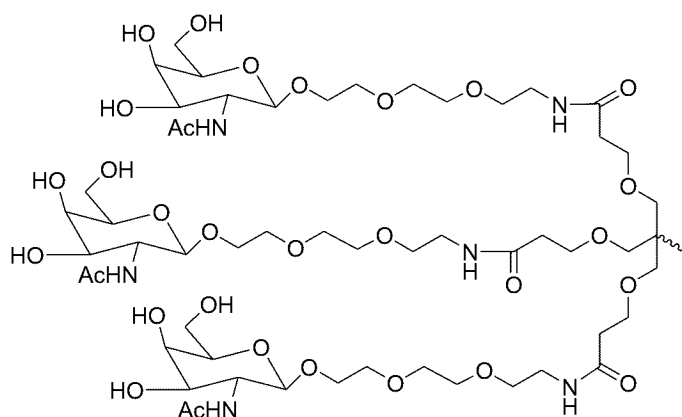
Формула VII,



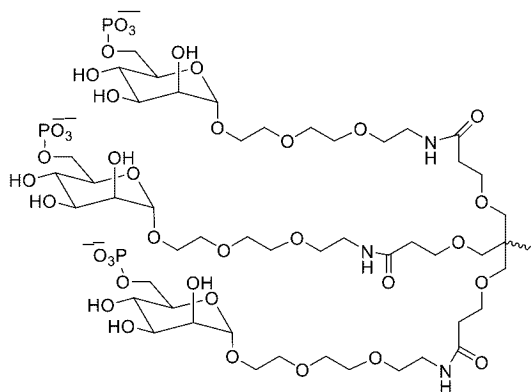
Формула VIII,



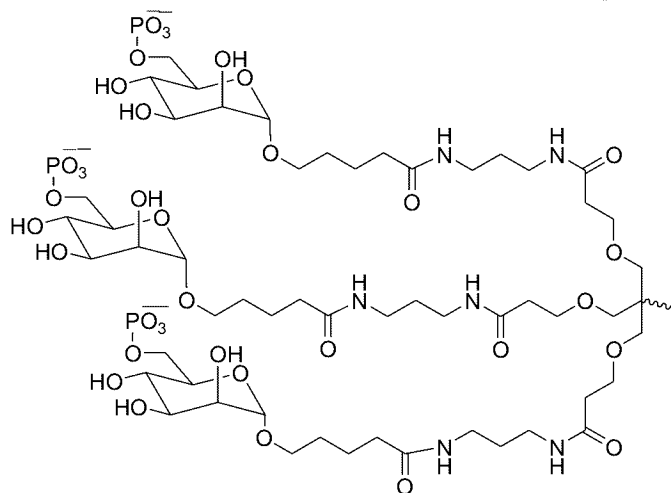
Формула IX,



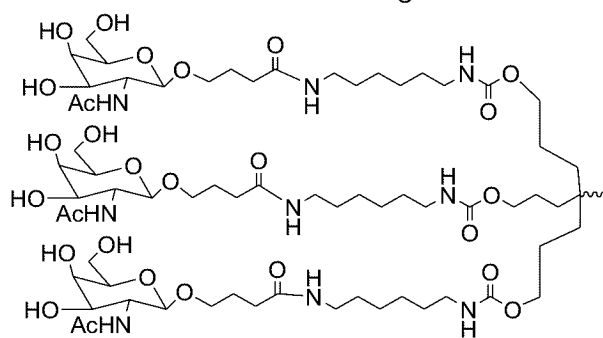
Формула X,



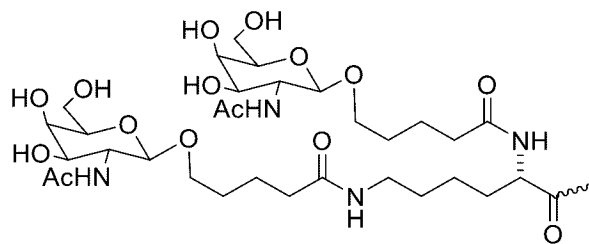
Формула XI,



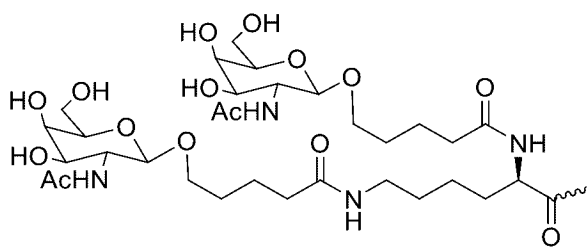
Формула XII,



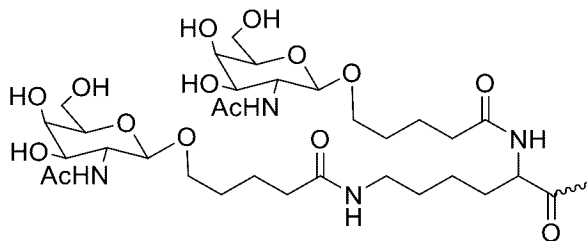
Формула XIII,



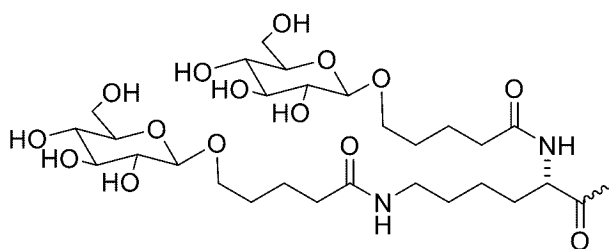
Формула XIV,



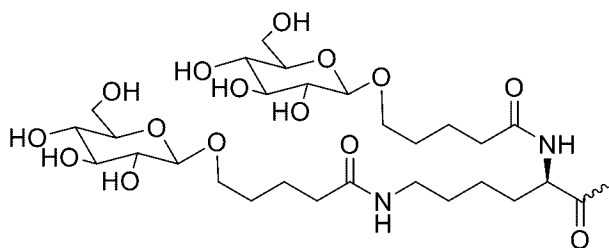
Формула XV,



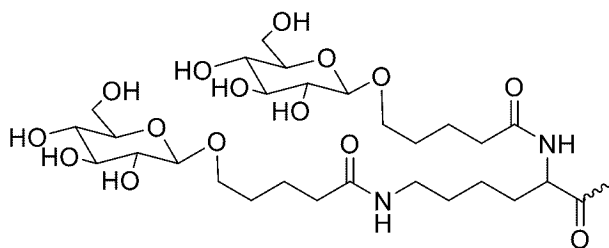
Формула XVI,



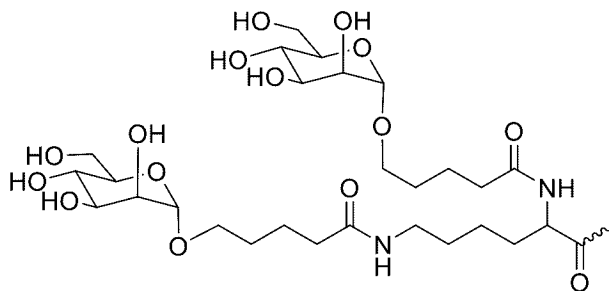
Формула XVII,



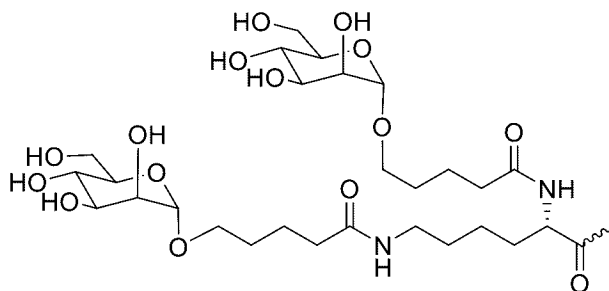
Формула XVIII,



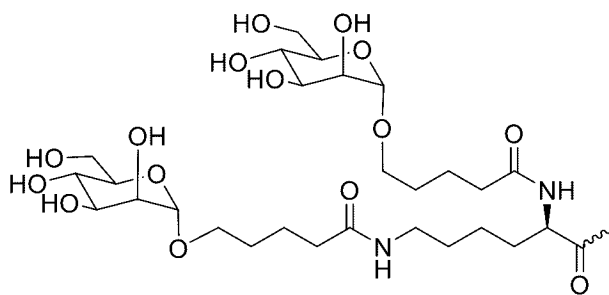
Формула XIX,



Формула XX,

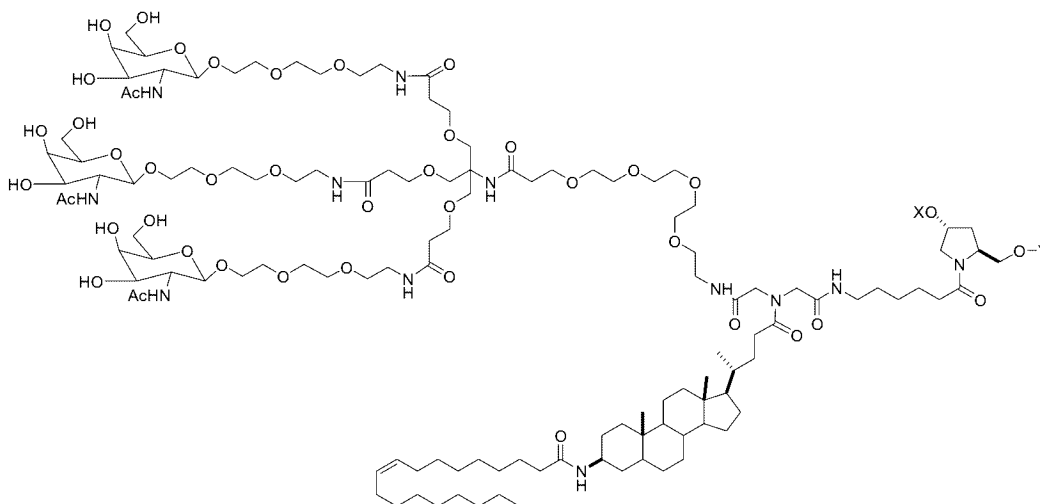


Формула XXI,



Формула XXII.

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



(формула XXIII),

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

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к средству на основе iRNA по настоящему изобретению посредством одновалентного линкера. В некоторых вариантах осуществления GalNAc или производное GalNAc присоединены к средству на основе iRNA по настоящему изобретению посредством двухвалентного линкера. В еще нескольких других вариантах осуществления настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к средству на основе iRNA по настоящему изобретению посредством трехвалентного линкера.

В одном варианте осуществления двухнитевые средства для RNAi по настоящему изобретению содержат одну молекулу GalNAc или производного GalNAc, присоединенную к средству на основе iRNA. В другом варианте осуществления двухнитевые средства для RNAi по настоящему изобретению содержат множество (например, 2, 3, 4, 5

или 6) молекул GalNAc или производных GalNAc, при этом каждая из них независимо присоединена к множеству нуклеотидов двухнитевого средства для RNAi посредством множества одновалентных линкеров.

В некоторых вариантах осуществления, например, если две нити средства на основе iRNA по настоящему изобретению являются частью одной более крупной молекулы и соединены непрерывающейся цепью нуклеотидов от 3'-конца одной нити до 5'-конца соответствующей другой нити, образующей петлю типа "шпилька", содержащую множество неспаренных нуклеотидов, то каждый неспаренный нуклеотид в петле типа "шпилька" может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенные посредством одновалентного линкера.

В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат дополнительно содержит один или несколько дополнительных лигандов, описанных выше, таких как, без ограничения, РК-модулятор и/или пептид, проникающий в клетку.

Дополнительные углеводные конъюгаты (и линкеры), подходящие для применения в настоящем изобретении, включают в себя описанные в РСТ-публикациях №№ WO 2014/179620 и WO 2014/179627, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки.

D. Линкеры

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

Термин "линкер" или "линкерная группа" означает органический фрагмент, который соединяет две части соединения, например, присоединяет друг к другу ковалентными связями две части соединения. Линкеры, как правило, содержат прямую связь или атом, такой как кислород или сера, звено, такое как NR8, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH, или цепь атомов, такую как, без ограничения, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил,

гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил, алкинилгетероциклилалкил, алкинилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, в котором одно или несколько метиленовых звеньев могут прерываться или оканчиваться O, S, S(O), SO₂, N(R₈), C(O), замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероциклический радикал; где R₈ представляет собой водород, ацил, алифатический или замещенный алифатический радикал. В одном варианте осуществления линкер имеет длину приблизительно 1-24 атома, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18 атомов, 7-17, 8-17, 6-16, 7-17 или 8-16 атомов.

Расщепляемая линкерная группа представляет собой группу, которая достаточно стабильна вне клетки, но которая при проникновении в клетку-мишень расщепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживает вместе. В предпочтительном варианте осуществления расщепляемая линкерная группа расщепляется в приблизительно 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или больше или по меньшей мере в приблизительно 100 раз быстрее в клетке-мишени или при первом эталонном условии (которое можно, например, выбрать для имитации или моделирования внутриклеточных условий), чем в крови субъекта или при втором эталонном условии (которое можно, например, выбрать для имитации или моделирования условий,

обнаруживаемых в крови или сыворотке крови).

Расщепляемые линкерные группы восприимчивы к факторам расщепления, например, pH, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию разрушающих молекул. Как правило, факторы расщепления более распространены или обнаруживаются на более высоких уровнях или с более высокой активностью внутри клеток, чем в сыворотке крови или крови. Примеры таких разрушающих средств включают в себя окислительно-восстановительные средства, которые выбирают для конкретных субстратов 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 линкерную группу, расщепляемую в ходе окислительно-восстановительных реакций, путем восстановления; эстераз; эндосом или средств, которые могут создавать кислую среду, например, такие, которые обуславливают значение pH, равное пяти или меньше; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушать линкерную группу, расщепляемую кислотами, действуя в качестве общей кислоты, пептидаз (которые могут быть субстрат-специфичными) и фосфатаз.

Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть восприимчивой к значению pH. Значение pH сыворотки крови человека составляет 7,4, в то время как среднее внутриклеточное значение pH является немного более низким и находится в диапазоне приблизительно 7,1-7,3. Эндосомы характеризуются более кислым значением pH в диапазоне 5,5-6,0, а лизосомы характеризуются еще более кислым значением pH, составляющим около 5,0. Некоторые линкеры будут иметь расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется при предпочтительном значении pH, за счет чего осуществляется высвобождение катионного липида из лиганда внутри клетки или в желаемый компартмент клетки.

Линкер может содержать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется под действием конкретного фермента. Тип расщепляемой линкерной группы, включенной в состав линкера, может зависеть от клетки, подлежащей нацеливанию. Например,

лиганд, нацеливающий на печень, может быть связан с катионным липидом посредством линкера, который содержит сложноэфирную группу. Клетки печени богаты эстеразами, и, следовательно, линкер будет расщепляться более эффективно в клетках печени, чем в типах клеток, не богатых эстеразами. Другие типы клеток, богатых эстеразами, включают в себя клетки легкого, коркового вещества почки и яичка.

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

Как правило, пригодность расщепляемой линкерной группы-кандидата можно оценить с помощью тестирования способности разрушающего средства (или условия) к расщеплению этой линкерной группы-кандидата. Кроме того, желательно также тестировать расщепляемую линкерную группу-кандидата в отношении способности противостоять расщеплению в крови или при контакте с другой тканью, не являющейся мишенью. Таким образом, можно определить относительную восприимчивость к расщеплению между первым и вторым условиями, где первое выбирают так, чтобы оно характеризовало расщепление в клетке-мишени, а второе выбирают так, чтобы оно характеризовало расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например, крови или сыворотке крови. Измерения можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органов или тканей или на животных в целом. Может быть полезно произвести первичные оценки в бесклеточных или культуральных условиях и подтвердить их дальнейшими оценками на животных в целом. В предпочтительных вариантах осуществления применимые соединения-кандидаты расщепляются по меньшей мере в приблизительно 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или в приблизительно 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой крови (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

i. Линкерные группы, расщепляемые в ходе окислительно-восстановительных реакций

В одном варианте осуществления расщепляемая линкерная группа представляет собой линкерную группу, расщепляемую в ходе окислительно-восстановительных реакций, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером линкерной группы, расщепляемой при восстановлении, является дисульфидная линкерная группа (-S-S-). Для определения того, является ли расщепляемая линкерная группа-кандидат подходящей "линкерной группой, расщепляемой при восстановлении" или, например, подходящей для применения с конкретным фрагментом iRNA и конкретным нацеливающим средством, можно обратиться к способам, описанным в данном документе. Например, кандидата можно оценить путем инкубирования с дитиотреитолом (DTT) или другим восстанавливающим средством с применением реагентов, известных из уровня техники, которые имитируют скорость расщепления, которая наблюдалась бы в клетке, например, клетке-мишени. Кандидатов также можно оценить в условиях, которые выбирают для имитации условий в крови или сыворотке крови. В одном варианте осуществления соединения-кандидаты расщепляются не более чем на приблизительно 10% в крови. В других вариантах осуществления применимые соединения-кандидаты 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 условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или условиями *in vitro*, выбранными для имитации внеклеточных условий). Скорость расщепления соединений-кандидатов 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 в клетках. Примерами фосфатных линкерных групп

являются $-O-P(O)(OR_k)-O-$, $-O-P(S)(OR_k)-O-$, $-O-P(S)(SR_k)-O-$, $-S-P(O)(OR_k)-O-$, $-O-P(O)(OR_k)-S-$, $-S-P(O)(OR_k)-S-$, $-O-P(S)(OR_k)-S-$, $-S-P(S)(OR_k)-O-$, $-O-P(O)(R_k)-O-$, $-O-P(S)(R_k)-O-$, $-S-P(O)(R_k)-O-$, $-S-P(S)(R_k)-O-$, $-S-P(O)(R_k)-S-$, $-O-P(S)(R_k)-S-$. Предпочтительными вариантами осуществления являются $-O-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(S)(SH)-O-$, $-S-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(O)(OH)-S-$, $-S-P(O)(OH)-S-$, $-O-P(S)(OH)-S-$, $-S-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(O)(H)-O-$, $-O-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-O-$, $-S-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-S-$, $-O-P(S)(H)-S-$. Предпочтительным вариантом осуществления является $-O-P(O)(OH)-O-$. Этих кандидатов можно оценить с помощью способов, аналогичных описанным выше.

iii. Линкерные группы, расщепляемые кислотами

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит линкерную группу, расщепляемую кислотами. Линкерная группа, расщепляемая кислотой, представляет собой линкерную группу, которая расщепляется в кислых условиях. В предпочтительных вариантах осуществления линкерные группы, расщепляемые кислотами, расщепляются в кислой среде со значением pH, составляющим 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 в качестве общей кислоты. В клетке определенные органеллы с низким значением pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечить расщепляющую среду для линкерных групп, расщепляемых кислотами. Примеры линкерных групп, расщепляемых кислотами, включают в себя без ограничения гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Группы, расщепляемые кислотами, могут характеризоваться общей формулой $-C=NN-$, $C(O)O$ или $-OC(O)$. Предпочтительным вариантом осуществления является случай, когда атом углерода, присоединенный к атому кислорода сложноэфирной группы (в алкоксигруппе), входит в состав арильной группы, замещенной алкильной группы или четвертичной алкильной группы, такой как диметилпентил или трет-бутил. Этих кандидатов можно оценить с помощью способов, аналогичных описанным выше.

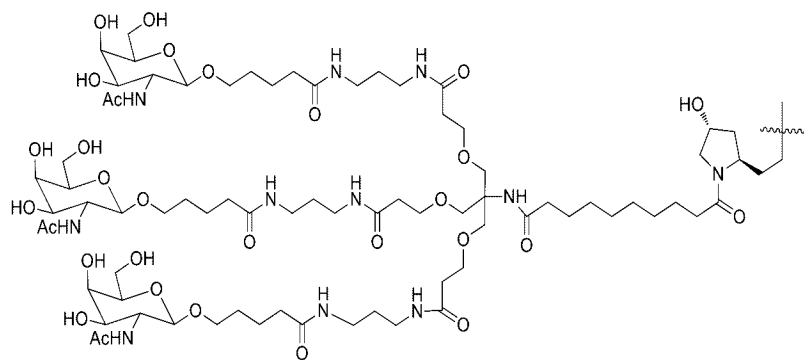
iv. Сложноэфирные линкерные группы В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит сложноэфирную

расщепляемую линкерную группу. Сложноэфирная расщепляемая линкерная группа расщепляется ферментами, такими как эстеразы и амидазы, в клетках. Примеры сложноэфирных расщепляемых линкерных групп включают в себя без ограничения сложноэфирные производные алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой $-C(O)O-$ или $-OC(O)-$. Этих кандидатов можно оценить с помощью способов, аналогичных описанным выше.

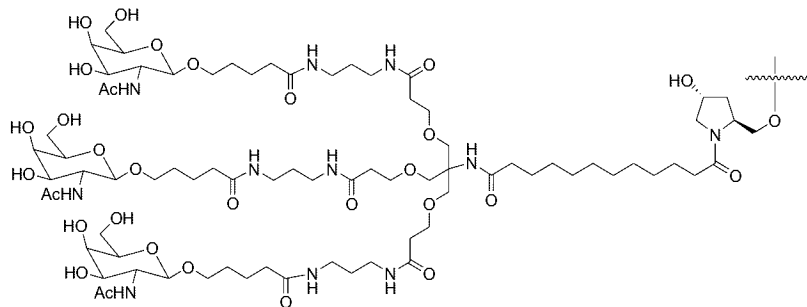
v. Пептидные расщепляемые группы

В еще одном варианте осуществления расщепляемый линкер содержит пептидную расщепляемую линкерную группу. Пептидная расщепляемая линкерная группа расщепляется ферментами, такими как пептидазы и протеазы, в клетках. Пептидные расщепляемые линкерные группы представляют собой пептидные связи, образующиеся между аминокислотами с получением олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т. д.) и полипептидов. Пептидные расщепляемые группы не включают в себя амидную группу $(-C(O)NH-)$. Амидная группа может быть образована между любыми алкиленами, алкениленами или алкиниленами. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образующейся между аминокислотами с получением пептидов и белков. Пептидная расщепляемая группа, как правило, ограничена пептидной связью (т. е. амидной связью), образующейся между аминокислотами с получением пептидов и белков, и не включает в себя 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. Этих кандидатов можно оценить с помощью способов, аналогичных описанным выше.

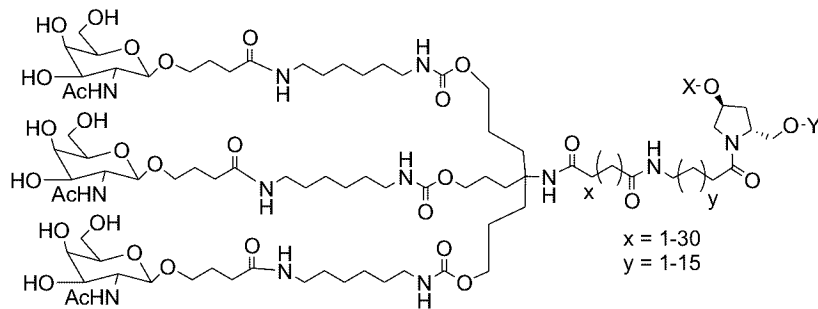
В одном варианте осуществления iRNA по настоящему изобретению конъюгирована с углеводом посредством линкера. Неограничивающие примеры конъюгатов iRNA-углевод с линкерами в композициях и способах по настоящему изобретению включают без ограничения



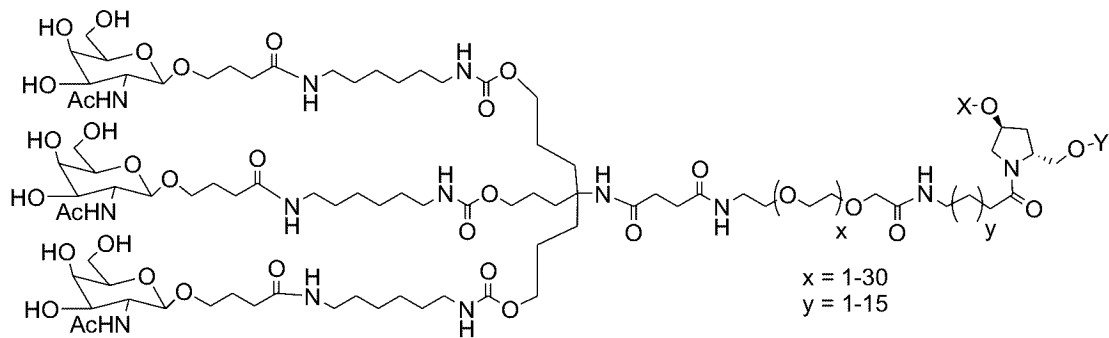
(формула XXIV) ,



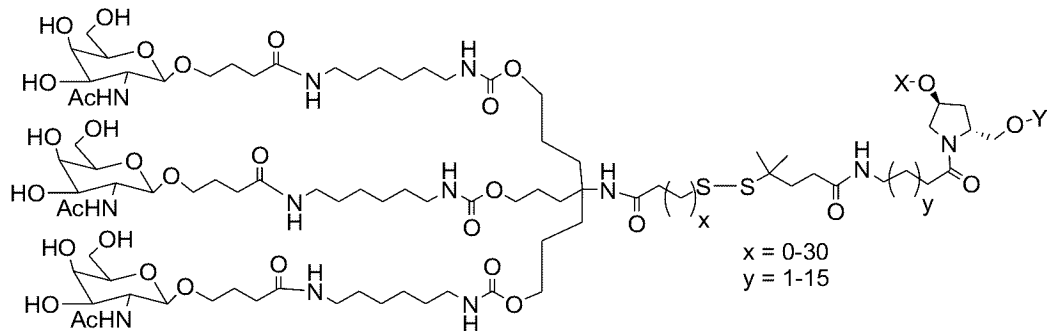
(формула XXV) ,



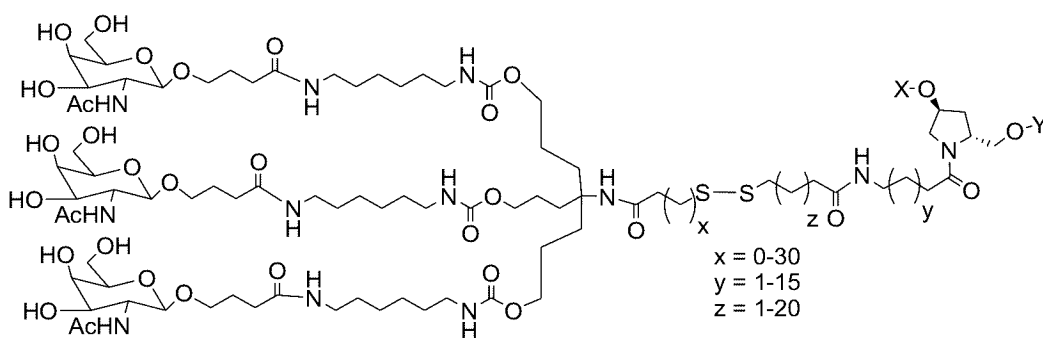
(формула XXVI) ,



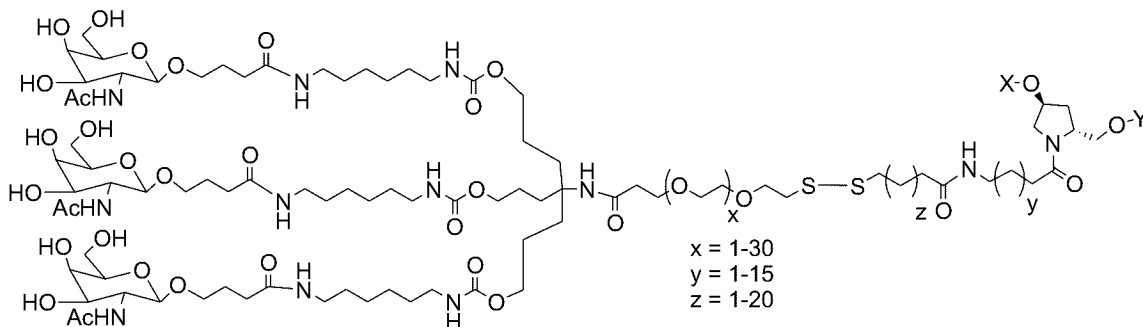
(формула XXVII) ,



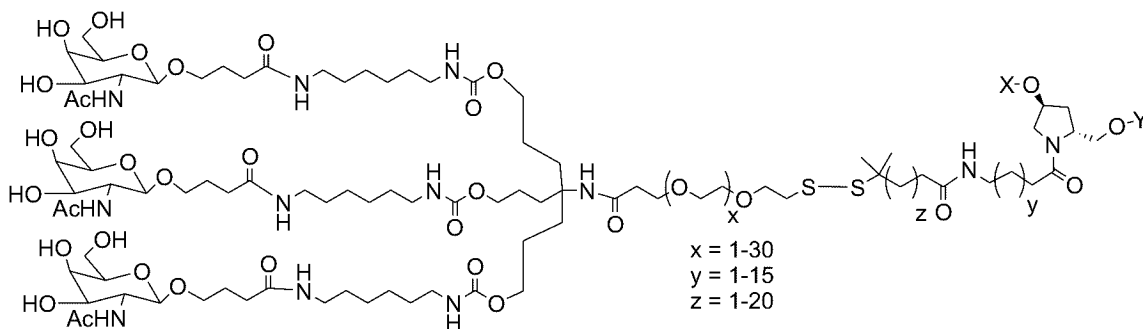
(формула XXVIII) ,



(формула XXVIX),



(формула XXX) и

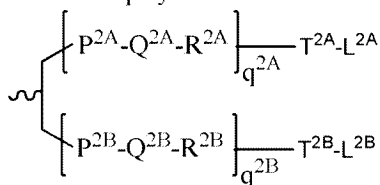


(формула XXXI), где один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, при этом другой представляет собой водород.

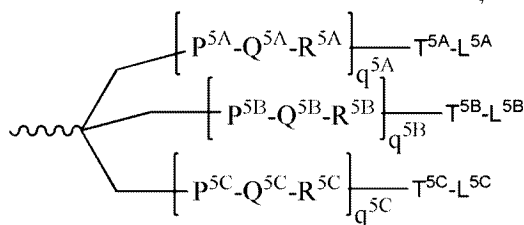
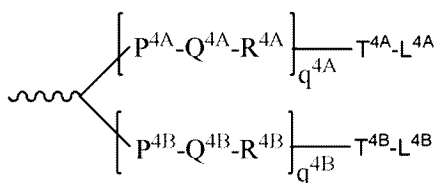
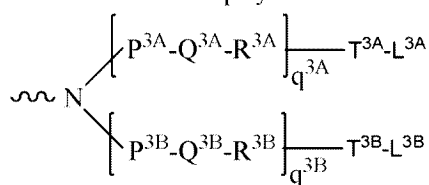
В определенных вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению лиганд представляет собой одну или несколько молекул производных GalNAc (N-ацетилгалактозамина), присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

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

Формула XXXII



Формула XXXIII



F

Формула XXXIV

Формула XXXV,

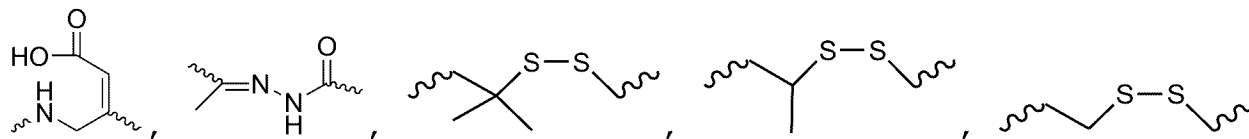
где:

q^{2A} , q^{2B} , q^{3A} , q^{3B} , q^{4A} , q^{4B} , q^{5A} , q^{5B} и q^{5C} независимо для каждого случая равняются 0-20, и где повторяющиеся звенья могут быть одинаковыми или различными;

каждый из R^{2A} , R^{2B} , R^{3A} , R^{3B} , R^{4A} , R^{4B} , R^{5A} , R^{5B} , R^{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), CH₂, CH₂NH или CH₂O;

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 одно или несколько метиленовых звеньев могут прерываться или оканчиваться одним или несколькими из O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

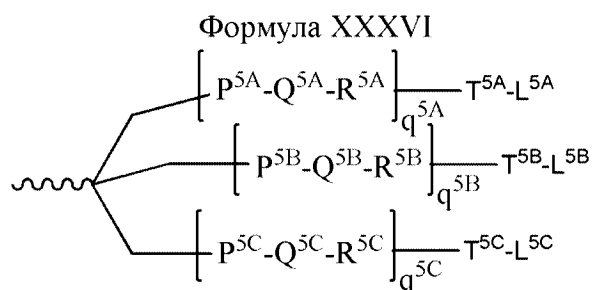
каждый из R^{2A} , R^{2B} , R^{3A} , R^{3B} , R^{4A} , R^{4B} , R^{5A} , R^{5B} , R^{5C} независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-O,



или 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 Н или боковую цепь аминокислоты. Трехвалентные линкеры, конъюгирующие производные GalNAc, особенно пригодны для применения со средствами для RNAi для ингибирования экспрессии гена-мишени, такие как характеризующиеся формулой (XXXVI):



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

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

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения конъюгатов РНК, включают без ограничения патенты США №№ 4828979; 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; 8106022, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Не является необходимым, чтобы все положения в данном

соединении были единообразно модифицированными, и в действительности несколько из вышеуказанных модификаций могут быть включены в одно соединение или даже в один 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 образован по меньшей мере из одного мономерного звена, т. е. нуклеотида в случае соединения на основе dsRNA. Такие iRNA, как правило, содержат по меньшей мере один участок, где РНК модифицирована таким образом, чтобы наделить iRNA увеличенной устойчивостью к разрушению нуклеазами, увеличенным поглощением клетками и/или увеличенным сродством связывания с нуклеиновой кислотой-мишенью. Дополнительный участок iRNA может служить в качестве субстрата для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. В качестве примера, РНКазы H представляет собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет нить РНК в дуплексе РНК:ДНК. Активация РНКазы H, следовательно, приводит к расщеплению РНК-мишени, за счет чего осуществляется значительное повышение эффективности ингибирования экспрессии гена с помощью iRNA. Следовательно, при применении химерных dsRNA по сравнению с фосфотиоатными дезокси-модифицированными dsRNA, гибридизирующимися с тем же участком-мишенью, зачастую можно получить сравнимые результаты с более короткими iRNA. Расщепление РНК-мишени можно обнаружить обычным путем с помощью гель-электрофореза и, при необходимости, с помощью соответствующих методик гибридизации нуклеиновых кислот, известных из уровня техники.

В некоторых случаях РНК из числа iRNA может быть модифицирована группой, не являющейся лигандом. Ряд молекул, не являющихся лигандами, конъюгировали с iRNA для повышения активности, распределения в клетке или поглощения клетками iRNA, и процедуры для выполнения таких типов конъюгирования доступны в научной литературе. Такие фрагменты, не являющиеся лигандами,

включают в себя липидные фрагменты, такие как холестерин (Kubo, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), холевая кислота (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), тиозфир, например, гексил-S-тритилтиол (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), алифатическая цепь, например, додекандиоловые или ундециловые остатки (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат триэтиламмония (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), полиаминная или полиэтиленгликолевая цепь (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969) или адамантануксусная кислота (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229) или октадециламиновый или гексиламинокарбонилноксистеринный фрагмент (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения таких конъюгатов РНК, были перечислены выше. Типичные протоколы конъюгирования предусматривают синтез РНК, несущих амиолинкер в одном или нескольких положениях последовательности. Амиогруппу затем вводят в реакцию с молекулой, подвергаемой конъюгированию, с применением соответствующих реагентов для реакций сочетания или активирующих реагентов. 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, приводит к получению чистого конъюгата.

IV. Доставка iRNA согласно настоящему изобретению

Доставку iRNA по настоящему изобретению в клетку, например, в клетку в организме субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект,

имеющий нарушение метаболизма липидов), можно осуществлять рядом различных путей. Например, доставку можно осуществлять путем приведения клетки в контакт с iRNA по настоящему изобретению *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 обсуждаются ниже.

Как правило, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) можно адаптировать для применения с iRNA по настоящему изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian RL., (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 и WO 94/02595, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Что касается доставки *in vivo*, то факторы, учитываемые для целей доставки молекулы iRNA, включают в себя, например, биологическую стабильность доставляемой молекулы, предупреждение неспецифических эффектов и накопление доставляемой молекулы в ткань-мишень. Неспецифические эффекты iRNA можно свести к минимуму путем локального введения, например, путем прямой инъекции или имплантации в ткань или местного введения препарата. При локальном введении в место обработки максимально увеличивается локальная концентрация средства, ограничивается воздействие средства на системные ткани, которые в ином случае могут быть повреждены средством или которые могут разрушить средство, и обеспечивается возможность введения более низкой общей дозы молекулы iRNA. Несколько исследований продемонстрировали успешный нокдаун продуктов генов при локальном введении iRNA. Например, как внутриглазная доставка dsRNA против VEGF путем интравитреальной инъекции у макаков-крабоедов (Tolentino, MJ. *et al.*, (2004) *Retina* 24:132-138), так и субретинальные инъекции у мышей (Reich, SJ. *et al.* (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) продемонстрировали предупреждение неоваскуляризации в экспериментальной модели возрастной макулярной дегенерации. В дополнение, при прямой

внутриопухолевой инъекции dsRNA мышам уменьшается размер опухоли (Pille, J., et al (2005) *Mol. Ther.* 11:267-274) и может продлеваться выживаемость мышей с опухолями (Kim, WJ. 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 путем прямой инъекции (Dorn, G., et al. (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH. et al. (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H. et al. (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., et al. (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya, Y., et al. (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602) и в легкие путем интраназального введения (Howard, KA. et al., (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X. et al., (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Bitko, V. et al., (2005) *Nat. Med.* 11:50-55). Что касается системного введения iRNA для лечения заболевания, РНК можно модифицировать или, в качестве альтернативы, доставлять с помощью системы доставки лекарственных средств; оба способа служат для предупреждения быстрого разрушения dsRNA эндо- и экзонуклеазами *in vivo*. Модификация РНК или фармацевтический носитель также могут обеспечивать возможность целенаправленного воздействия композиции на основе iRNA на ткань-мишень и избегания нежелательных нецелевых эффектов. Молекулы iRNA можно модифицировать посредством химического конъюгирования с липофильными группами, такими как холестерин, для повышения поглощения клетками и предупреждения разрушения. Например, направленную против AroB iRNA, конъюгированную с липофильным холестериновым фрагментом, инъецировали системно мышам, что приводило к нокдауну мРНК aroB как в печени, так и в тонкой кишке (Soutschek, J., et al (2004) *Nature* 432:173-178). Как было показано, конъюгирование iRNA с аптамером ингибирует рост опухоли и опосредует регрессию опухоли в мышинной модели рака предстательной железы (McNamara, JO. et al., (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). В альтернативном варианте осуществления iRNA можно доставлять с помощью систем доставки лекарственных средств, таких как наночастица, дендример,

полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки содействуют связыванию молекулы iRNA (отрицательно заряженной), а также усиливают взаимодействия на отрицательно заряженной клеточной мембране, обеспечивая возможность эффективного поглощения iRNA клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут быть связанными с iRNA либо в результате индуцирования образовывать пузырьки или мицеллу (см., например, Kim SH. et al., (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), которые заключают в себе iRNA. Образование пузырьков или мицелл также предупреждает разрушение iRNA при системном введении. Способы получения и введения катионных комплексов с iRNA находятся вполне в пределах квалификации специалистов в данной области (см., например, Sorensen, DR., et al. (2003) *J. Mol. Biol* 327:761-766; Verma, UN. et al., (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS et al., (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственных средств, применимых для системной доставки iRNA, включают в себя DOTAP (Sorensen, DR., et al (2003), выше; Verma, UN. et al., (2003), выше), Oligofectamine, "твердые частицы нуклеиновая кислота-липид" (Zimmermann, TS. et al., (2006) *Nature* 441:111-114), кардиолипид (Chien, PY. et al., (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A. et al., (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), полиэтиленимин (Bonnet ME. et al., (2008) *Pharm. Res.* Aug 16, электронная публикация до выхода из печати; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), пептиды Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487) и полиамидоамины (Tomalia, DA. et al., (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H. et al., (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). В некоторых вариантах осуществления iRNA образует комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции на основе iRNA и циклодекстринов можно найти в патенте США № 7427605, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

A. Вектор, кодирующий iRNA по настоящему изобретению

iRNA, целенаправленно воздействующая на ген ANGPTL3, может экспрессироваться с единиц транскрипции, вставленных в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture, A, *et al.*, TIG. (1996), 12:5-10; Skillern, A., *et al.*, международная PCT-публикация № WO 00/22113, Conrad, международная PCT-публикация № WO 00/22114, и Conrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть транзистентной (порядка от нескольких часов до недель) или стабильной (от недель до месяцев или дольше) в зависимости от конкретной применяемой конструкции и ткани-мишени или типа клеток-мишеней. Такие трансгены можно вводить в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может представлять собой интегрирующий или неинтегрирующий вектор. Трансген также может быть сконструирован с обеспечением возможности наследования его в виде внехромосомной плазмиды (Gassmann, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

Отдельная нить или нити iRNA могут транскрибироваться с промотора в векторе экспрессии. Если две отдельные нити подлежат экспрессии с получением, например, dsRNA, то в клетку-мишень можно совместно вводить два отдельных вектора экспрессии (например, путем трансфекции или инфицирования). В альтернативном случае каждая отдельная нить dsRNA может транскрибироваться с помощью промоторов, оба из которых расположены в одной и той же экспрессионной плазмиде. В одном варианте осуществления dsRNA экспрессируется в виде полинуклеотидов инвертированного повтора, соединенных линкерной полинуклеотидной последовательностью таким образом, 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 применять для получения рекомбинантных конструкций для экспрессии iRNA, которая описана в данном документе. Векторы экспрессии для эукариотических клеток хорошо известны из уровня техники и доступны из ряда коммерческих источников. Как правило, предусмотрено, что такие векторы содержат подходящие сайты

рестрикции для вставки желаемого сегмента нуклеиновой кислоты. Доставка векторов, экспрессирующих iRNA, может быть системной, как, например, посредством внутривенного или внутримышечного введения, посредством введения в клетки-мишени, explantированные от пациента, с последующим обратным введением пациенту или посредством любого другого способа, который обеспечивает возможность введения в желаемую клетку-мишень.

Вирусные векторные системы, которые можно использовать со способами и композициями, описанными в данном документе, включают в себя без ограничения (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, в том числе без ограничения лентивирусные векторы, вирус мышинного лейкоза Молони и т. д.; (c) векторы на основе аденоассоциированного вируса; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (e) векторы на основе SV40; (f) векторы на основе полиомавирусов; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) векторы на основе пикорнавирусов; (i) векторы на основе поксвирусов, таких как ортопоксвирус, например, векторы на основе вируса осповакцины, или авипоксвирус, например, поксвирус канареек или вирус оспы птиц; и (j) зависимый от вируса-помощника или "выпотрошенный" аденовирус. Также преимущественными могут быть вирусы, дефектные по репликации. Различные векторы будут встраиваться или не будут встраиваться в геном клеток. При желании конструкции могут содержать вирусные последовательности для трансфекции. В качестве альтернативы, конструкция может быть включена в состав векторов, способных к эписомальной репликации, например, векторов 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 клетках-мишенях. Другие аспекты, учитываемые в отношении векторов и конструкций, известны из уровня техники.

V. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые содержат 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 ANGPTL3, например, нарушения метаболизма липидов, например, наследственного нарушения, такого как семейная гипертриглицеридемия, семейная очаговая липодистрофия 1 типа (FPLD1), или индуцированного или приобретенного нарушения, такое как нарушение, индуцированное или приобретенное в результате заболевания, нарушения или состояния (например, почечной недостаточности), влияния рациона питания или приема определенных лекарственных средств (например, в результате влияния высокоактивной антиретровирусной терапии (HAART), применяемой для лечения, например, AIDS или HIV).

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

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена ANGPTL3. Как правило, подходящая доза iRNA по настоящему изобретению будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 200,0 миллиграмма на килограмм веса тела получающего ее пациента 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.

Режим повторных доз может предусматривать введение терапевтического количества iRNA на регулярной основе, как, например, от раза в два дня до раза 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 в три месяца).

После выполнения режима начального лечения лекарственные препараты можно вводить с меньшей частотой.

Специалисту в данной области будет понятно, что на дозу и временные рамки, необходимые для эффективного лечения субъекта, могут влиять определенные факторы, в том числе без ограничения тяжесть 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 включать в себя однократное лечение или курс лечения. Установление эффективных доз и периодов полувыведения *in vivo* для отдельных iRNA, охватываемых настоящим изобретением, можно проводить с применением традиционных методик или на основании тестирования *in vivo* с применением соответствующей животной модели, как описано в других местах в данном документе.

Достижения в области генетики мышей обеспечили создание ряда мышинных моделей для изучения различных заболеваний человека, таких как нарушения метаболизма липидов, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии ANGPTL3. Такие модели можно применять для проведения тестирования iRNA *in vivo*, а также для определения терапевтически эффективной дозы. Подходящие мышинные модели известны из уровня техники и включают в себя, например, мышей с ожирением (ob/ob), имеющих мутацию в гене ожирения (ob) (Wiegman *et al.*, (2003) *Diabetes*, 52:1081-1089); мышей, имеющих гомозиготный нокаут гена рецептора LDL (мышей LDLR -/- ; Ishibashi *et al.*, (1993) *J Clin Invest* 92(2):883-893); мышиную модель алиментарного атеросклероза (Ishida *et al.*, (1991) *J. Lipid. Res.*, 32:559-568); и мышиную модель гетерозиготного нокаута гена липопротеинлипазы (Weistock *et al.*, (1995) *J. Clin. Invest.* 96(6):2555-2568).

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 в себя 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 в себя трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, распыляемые растворы, жидкости и порошки. Могут быть необходимы или желательны традиционные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и т. п. Также могут быть применимы презервативы с покрытием, перчатки и т. п. Подходящие составы для местного введения включают составы, в которых iRNA, представленные в настоящем изобретении, находятся в смеси со средством для местной доставки, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие средства и поверхностно-активные вещества. Подходящие липиды и липосомы включают в себя нейтральные (например, диолеоилфосфатидилэтаноламин DOPE, димиристоилфосфатидилхолин DMPC, дистеароилфосфатидилхолин), отрицательно заряженные (например, димиристоилфосфатидилглицерин DMPG) и катионные (например, диолеоилтетраметиламинопропил DOTAP и диолеоилфосфатидилэтаноламин DOTMA). iRNA, представленные в настоящем изобретении, могут быть инкапсулированы в липосомах или могут образовывать комплексы с ними, в частности, с катионными липосомами. В качестве альтернативы, iRNA могут

образовывать комплексы с липидами, в частности, с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают в себя 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-додецилазаациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или C₁₋₂₀алкиловый сложный эфир (например, изопропилмиристат (IPM)), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль. Составы для местного введения подробно описаны в патенте США № 6747014, который включен в данный документ посредством ссылки.

Композиции и составы для перорального введения включают в себя порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводных средах, капсулы, желатиновые капсулы, пакетики-саше, таблетки или микротаблетки. Могут быть желательными загустители, ароматизирующие вещества, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие средства или связующие вещества. В некоторых вариантах осуществления составы для перорального введения являются такими, в которых dsRNA, представленные в настоящем изобретении, вводят в сочетании с одним или несколькими веществами, способствующими проникновению, поверхностно-активными веществами и хелаторами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают в себя жирные кислоты и/или их сложные эфиры или соли, желчные кислоты и/или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли желчных кислот включают в себя 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 в себя арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую

кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую). В некоторых вариантах осуществления применяют 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 в себя лауриловый эфир полиоксиэтилена 9, цетиловый эфир полиоксиэтилена 20. DsRNA, представленные в настоящем изобретении, можно доставлять перорально, в форме гранул, в том числе в форме частиц, высушенных распылением, или в комплексе с образованием микро- или наночастиц. Комплексообразующие средства для dsRNA включают в себя полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксетаны, полиалкилцианоакрилаты; катионированные виды желатина, альбумины, виды крахмала, акрилаты, полиэтиленгликоли (PEG) и виды крахмала; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-derivatизированные полиимины, пуллуланы, виды целлюлозы и виды крахмала. Подходящие комплексообразующие средства включают в себя хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламинометилэтилен (PTDAE), полиаминостирол (например, п-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D,L-молочную кислоту), сополимер D,L-молочной и гликолевой кислот (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG). Составы для перорального введения для dsRNA и их получение подробно описаны в патенте США № 6887906, публикации заявки на патент США № 20030027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

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

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают в себя без ограничения растворы, эмульсии и составы, содержащие липосомы. Такие композиции можно получить из разнообразных компонентов, которые включают в себя без ограничения предварительно полученные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. Особенно предпочтительными являются составы, которые целенаправленно воздействуют на печень при лечении нарушений со стороны печени, таких как карцинома печени.

Фармацевтические составы по настоящему изобретению, которые в целях удобства могут быть представлены 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). Как правило, составы получают путем равномерного и тщательного приведения активных ингредиентов во взаимодействие с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями или как первыми, так и вторыми, а затем, при необходимости, придания продукту формы.

Композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в какой-либо из многих возможных лекарственных форм, таких как, без ограничения, таблетки, капсулы, желатиновые капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели, суппозитории и клизмы. Композиции по настоящему изобретению также могут быть составлены в виде суспензий в водных, неводных или смешанных средах. Водные суспензии могут дополнительно содержать вещества, которые

увеличивают вязкость суспензии, в том числе, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

А. Дополнительные составы

і. Эмульсии

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

Фармацевтические наполнители, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты, также могут присутствовать в эмульсиях при необходимости. Фармацевтические эмульсии также могут представлять собой множественные эмульсии, которые состоят из более чем двух фаз, как, например, в случае эмульсий по типу "масло/вода/масло" (o/w/o) и "вода/масло/вода" (w/o/w). Такие сложные составы часто обеспечивают определенные преимущества, которые не обеспечивают простые двухкомпонентные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные масляные капельки эмульсии по типу o/w заключают мелкие капельки воды, составляют эмульсию по типу w/o/w. Аналогично этому, система масляных капелек, заключенная в капельках воды, стабилизированных в масляной непрерывной фазе, представляет собой эмульсию по типу o/w/o.

Эмульсии характеризуются малой термодинамической стабильностью либо ее отсутствием. Диспергированная или рассеянная фаза эмульсии зачастую хорошо диспергирована во внешней или непрерывной фазе и поддерживается в такой форме благодаря эмульгаторам или вязкости состава. Любая фаза эмульсии может быть полутвердой или твердой, как и в случае мазевых основ и кремов эмульсионного типа. Другие способы стабилизации эмульсий охватывают применение эмульгаторов, которые могут быть включены в состав любой фазы эмульсии. Эмульгаторы можно классифицировать на четыре широкие 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, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как сурфактанты, нашли широкое применение в составлении эмульсий и были рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery

Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Поверхностно-активные вещества, как правило, 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 можно классифицировать на различные классы, исходя из природы гидрофильной группы: неионогенные, анионные, катионные и амфотерные (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

Встречающиеся в природе эмульгаторы, применяемые в эмульсионных составах, включают в себя 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. Тонкодисперсные твердые вещества также применяли в качестве хороших эмульгаторов, в особенности в комбинации с поверхностно-активными веществами и в вязких препаратах. Они включают в себя полярные неорганические твердые вещества, такие как гидроксиды тяжелых металлов, ненабухающие глины, такие как бентонит, аттапульгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный силикат алюминия и коллоидный алюмосиликат магния, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как углерод или глицерилтристеарат.

В эмульсионные составы также включают большое разнообразие неэмульгирующих материалов, и они обуславливают определенные свойства эмульсий. Они включают в себя жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, жирные сложные эфиры, 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 в себя встречающиеся в природе смолы и синтетические полимеры, такие как полисахариды (например, гуммиарабик, агар, альгиновую кислоту, каррагинан, гуаровую камедь, камедь карайи и трагакант), производные целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлозу и карбоксипропилцеллюлозу) и синтетические полимеры (например, карбомеры, эфиры целлюлозы и карбоксивиниловые полимеры). Они диспергируются или набухают в воде с образованием коллоидных растворов, которые стабилизируют эмульсии путем образования прочных пленок на границе раздела фаз вокруг капелек диспергированной фазы и путем увеличения вязкости внешней фазы.

Поскольку эмульсии часто содержат ряд ингредиентов, таких как углеводы, белки, стеролы и фосфатиды, которые могут легко поддерживать рост микробов, то такие составы часто содержат консерванты. Широко применяемые консерванты, включаемые в эмульсионные составы, включают в себя метилпарабен, пропилпарабен, соли четвертичного аммония, хлорид бензалкония, сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты и борную кислоту. Антиоксиданты также обычно добавляют в эмульсионные составы для предупреждения ухудшения качества состава. Применяемые антиоксиданты могут являться "ловушками" свободных радикалов, такими как токоферолы, алкилгаллаты, 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 производства были рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Эмульсионные составы для пероральной доставки очень широко применяют ввиду удобства составления, а также эффективности с точки зрения абсорбции и биодоступности (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and 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 о/в.

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 из воды, масла и амфифильного вещества, которая является единым оптически изотропным и термодинамически стабильным жидким раствором (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Обычно микроэмульсии являются системами, которые получают путем вначале диспергирования масла в водном растворе

поверхностно-активного вещества, а затем добавления достаточного количества четвертого компонента, как правило, спирта со средней длиной цепи, для образования прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также были описаны как термодинамически стабильные, изотропно чистые дисперсии двух несмешиваемых жидкостей, которые стабилизируются пленками из поверхностно-активных молекул на границе раздела фаз (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 в себя масло, воду, поверхностно-активное вещество, вторичное поверхностно-активное вещество и электролит. То, является ли микроэмульсия эмульсией по типу "вода в масле" (w/o) или "масло в воде" (o/w), зависит от свойств применяемого 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, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). По сравнению с традиционными эмульсиями микроэмульсии обеспечивают преимущество солюбилизации нерастворимых в воде лекарственных средств в составе из термодинамически стабильных капелек, которые образуются самопроизвольно.

Поверхностно-активные вещества, применяемые в получении микроэмульсий, включают в себя без ограничения ионные

поверхностно-активные вещества, неионогенные поверхностно-активные вещества, Brij 96, олеиловые эфиры полиоксиэтилена, сложные эфиры жирных кислот и полиглицерина, монолаурат тетраглицерина (ML310), моноолеат тетраглицерина (MO310), моноолеат гексаглицерина (PO310), пентаолеат гексаглицерина (PO500), монокапрат декаглицерина (MCA750), моноолеат декаглицерина (MO750), сесквиолеат декаглицерина (SO750), декаолеат декаглицерина (DA0750) отдельно или в комбинации с вторичными поверхностно-активными веществами. Вторичное поверхностно-активное вещество, обычно представляющее собой короткоцепочечный спирт, такой как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит для увеличения текучести на границе раздела фаз посредством проникновения в пленку из поверхностно-активного вещества и последующего формирования неупорядоченной пленки благодаря пустому пространству, образуемому среди молекул поверхностно-активного вещества. Однако микроэмульсии могут быть получены без применения вторичных поверхностно-активных веществ, и из уровня техники известны бесспиртовые самоэмульгирующиеся микроэмульсионные системы. Водная фаза, как правило, без ограничения может представлять собой воду, 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 (C8-C12) моно-, ди- и триглицериды, сложные эфиры полиоксиэтилированного глицерина и жирных кислот, жирные спирты, полиглицеринизированные глицериды, насыщенные полиглицеринизированные C8-C10-глицериды, растительные масла и кремнийорганическое масло.

Микроэмульсии представляют особый интерес с точки зрения солюбилизации лекарственного средства и повышенной абсорбции лекарственных средств. Липидные микроэмульсии (как по типу о/в, так и по типу в/о) были предложены для повышения биодоступности лекарственных средств, в том числе пептидов, при пероральном введении (см., например, патенты США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides et al., Pharmaceutical

Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). Микроэмульсии обеспечивают преимущества в виде улучшенной солюбилизации лекарственного средства, защиты лекарственного средства от ферментативного гидролиза, возможного повышения абсорбции лекарственного средства за счет индуцированных поверхностно-активным веществом изменений текучести и проницаемости мембран, удобства получения, удобства перорального введения по сравнению с твердыми лекарственными формами, улучшенной клинической действенности и уменьшенной токсичности (см., например, патенты США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143). Часто микроэмульсии могут образовываться самопроизвольно, когда их компоненты объединяют при температуре окружающей среды. Это может быть в особенности преимущественным при составлении термолабильных лекарственных средств, пептидов или iRNA. Микроэмульсии также были эффективными при трансдермальной доставке активных компонентов как в косметических, так и в фармацевтических путях применения. Предполагается, что микроэмульсионные композиции и составы по настоящему изобретению будут содействовать увеличению системной абсорбции iRNA и нуклеиновых кислот из желудочно-кишечного тракта, а также улучшать локальное поглощение iRNA и нуклеиновых кислот клетками.

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

Каждый из этих классов обсуждался выше.

iii. Микрочастицы

Средство для RNAi по настоящему изобретению может быть включено в состав частицы, например, микрочастицы. Микрочастицы можно получать путем высушивания распылением, но также можно получать другими способами, в том числе путем лиофилизации, выпаривания, сушки в псевдоожиженном слое, сушки в вакууме или с помощью комбинации этих методик.

iv. Вещества, способствующие проникновению

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении используют разнообразные вещества, способствующие проникновению, для осуществления эффективной доставки нуклеиновых кислот, в частности, iRNA, в кожу животных. Большинство лекарственных средств присутствуют в растворе как в ионизированной, так и в неионизированной форме. Однако, как правило, только липидорастворимые или липофильные лекарственные средства легко проходят через клеточные мембраны. Было установлено, что даже нелипофильные лекарственные средства могут проходить через клеточные мембраны, если мембрана, через которую необходимо пройти, обработана веществом, способствующим проникновению. В дополнение к тому, что они способствуют 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 широких категорий, т. е. поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие средства и нехелатирующие вещества, не являющиеся поверхностно-активными (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Каждый из вышеуказанных классов веществ, способствующих проникновению, описан ниже более подробно.

Поверхностно-активные вещества (или "сурфактанты") являются химическими объектами, которые при растворении в водном растворе

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

Разнообразные жирные кислоты и их производные, которые действуют в качестве веществ, способствующих проникновению, включают в себя, 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, арахионовую кислоту, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, их C₁₋₂₀алкиловые сложные 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 диспергировании и абсорбции липидов и жирорастворимых витаминов (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 в Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New

York, 1996, pp. 934-935). Разные природные соли желчных кислот и их синтетические производные действуют в качестве веществ, способствующие проникновению. Таким образом, термин "соли желчных кислот" включает в себя любые встречающиеся в природе компоненты желчи, а также любые из их синтетических производных. Подходящие соли желчных кислот включают в себя, 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), таурodeзоксихолевую кислоту (таурodeзоксихолат натрия), хенодезоксихолевую кислоту (хенодезоксихолат натрия), урсодезоксихолевую кислоту (UDCA), тауро-24,25-дигидрофузидат натрия (STDHF), гликодигидрофузидат натрия и лауриловый эфир полиоксиэтилена 9 (POE) (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita et al., *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583).

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 в себя без ограничения этилендиаминтетраацетат динатрия (EDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат, 5-метоксисалицилат и гомовалинат натрия), N-ацилпроизводные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацилпроизводные бета-дикетонных (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).

Применяемые в данном документе нехелатирующие соединения, способствующие проникновению, которые не являются поверхностно-активными, могут быть определены как соединения, которые демонстрируют незначительную 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 в себя, например, ненасыщенные цикломочевины, производные 1-алкил- и 1-алкенилазациклоалканона (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 в фармацевтические и другие композиции 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., PCT-заявка WO 97/30731), также, как известно, повышают поглощение dsRNA клетками. Примеры коммерчески доступных реагентов для трансфекции включают в себя, среди прочего, например,

Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), 293fectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Cellfectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), DMRIE-C™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), RNAiMAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Oligofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Optifect™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), реагент для трансфекции X-tremeGENE Q2 (Roche; Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомальной трансфекции DOTAP (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомальной трансфекции DOSPER (Грензахерштрассе, Швейцария) или Eugene (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент Transfectam® (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент для трансфекции TransFast™ (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-20 (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-50 (Promega; Мэдисон, Висконсин), DreamFect™ (OZ Biosciences; Марсель, Франция), EcoTransfect (OZ Biosciences; Марсель, Франция), реагент для трансфекции TransPass^a D1 (New England Biolabs; Ипсвич, Массачусетс, США), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции PerFectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции NeuroPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER 2 (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции Cytfectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции BaculoPORTER (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 вводимых 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. Как используется в данном документе, "соединение-носитель" или "носитель" может относиться к нуклеиновой кислоте или ее аналогу, которые являются инертными (т. е. сами по себе не обладают биологической активностью), но распознаются в качестве нуклеиновой кислоты в ходе процессов *in vivo*, которые снижают биодоступность нуклеиновой кислоты, обладающей биологической активностью, например, путем разрушения биологически активной нуклеиновой кислоты или путем способствования ее удалению из кровотока. Совместное введение нуклеиновой кислоты и соединения-носителя, обычно с избытком последнего вещества, может привести к существенному снижению количества нуклеиновой кислоты, извлекаемого в печени, почках или других внесосудистых резервуарах, предположительно вследствие конкуренции между соединением-носителем и нуклеиновой кислотой за общий рецептор. Например, извлечение частично фосфотиоатной dsRNA в ткани печени может быть снижено при ее совместном введении с полиинозиновой кислотой, сульфатом декстрана, полицитидиновой кислотой или 4-ацетиамидо-4'-изотиоцианостильбен-2,2'-дисульфоновой кислотой (Miyao *et al.*, DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura *et al.*, DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183).

vi. Наполнители

В отличие от соединения-носителя, "фармацевтический носитель" или "наполнитель" представляет собой фармацевтически приемлемые растворитель, суспендирующее средство или любое другое фармакологически инертное средство 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 общий объем, консистенцию и т. д. при объединении с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Типичные фармацевтические носители включают в себя без ограничения связывающие средства (например, прежелатинизированный маисовый крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и т. д.); наполнители (например, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин, сульфат кальция, этилцеллюлозу, полиакрилаты или гидрофосфат кальция и т. д.); смазывающие вещества (например, 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, крахмалгликолят натрия и т. д.) и смачивающие средства (например, лаурилсульфат натрия и т. д.).

Также для составления композиций по настоящему изобретению можно применять фармацевтически приемлемые органические или неорганические наполнители, подходящие для непарентерального введения, которые не реагируют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают в себя 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 в себя стерильные и нестерильные водные растворы, неводные растворы в обычных растворителях, таких как спирты, или растворы нуклеиновых кислот в жидких или твердых масляных основах. Растворы также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Можно применять фармацевтически приемлемые органические или неорганические наполнители, подходящие для непарентерального введения, которые не реагируют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами.

Подходящие фармацевтически приемлемые наполнители включают в себя 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 техники. Таким образом, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные материалы, такие как, например, противозудные средства, вяжущие средства, анестетики или противовоспалительные средства локального действия, 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 чрезмерно препятствовать проявлению форм биологической активности компонентов композиций по настоящему изобретению. Составы могут быть стерилизованными и, при необходимости, смешанными со вспомогательными средствами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими средствами, эмульгаторами, солями для оказания влияния на осмотическое давление, буферами, красящими веществами, ароматизаторами и/или отдушками и т. п., которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновой (нуклеиновыми) кислотой (кислотами) состава.

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

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в настоящем изобретении, содержат (a) одно или несколько соединений на основе iRNA и (b) одно или несколько средств, которые функционируют по механизму, отличному от RNAi, и которые являются применимыми в лечении нарушения метаболизма липидов. Примеры таких средств включают без

ограничения противовоспалительное средство, антистеатозное средство, противовирусное и/или антифиброзное средство. 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 в себя телбивудин, энтекавир и ингибиторы протеазы, такие как телапревир и другие, раскрытые, например, в публикациях заявок на патенты США №№ 2005/0148548, 2004/0167116 и 2003/0144217 Tung et al., а также в публикации заявки на патент США № 2004/0127488 Hale et al.

Токсичность и терапевтическую эффективность таких соединений можно определить с помощью стандартных фармацевтических процедур в культурах клеток или на экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ (дозы, летальной для 50% популяции) и ED₅₀ (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение доз для токсических и терапевтических эффектов представляет собой терапевтический индекс, и его можно выразить как соотношение LD₅₀/ED₅₀. Предпочтительными являются соединения, которые характеризуются высоким терапевтическим индексом.

Данные, полученные в анализах культур клеток и исследованиях на животных, можно использовать при определении диапазона доз для применения у людей. В настоящем изобретении доза композиций, представленных в данном документе, как правило, находится в диапазоне циркулирующих концентраций, которые включают в себя ED₅₀ с малой токсичностью или без таковой. Доза может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, применяемого в способах, представленных в настоящем изобретении, терапевтически эффективную дозу можно первоначально установить по результатам анализов культур клеток. Дозу можно определять в животных моделях для получения диапазона циркулирующих концентраций в плазме крови для соединения или, при необходимости, полипептидного продукта последовательности-мишени (например, для достижения уменьшенной концентрации полипептида), который включает IC₅₀ (т. е. концентрацию тестового

соединения, при которой достигается полумаксимальное ингибирование симптомов), определяемую в культуре клеток. Такую информацию можно использовать для более точного определения применимых доз для людей. Уровни в плазме крови можно измерять, например, посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение к их введению, обсуждаемому выше, iRNA, представленные в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными средствами, эффективными в лечении патологических процессов, опосредованных экспрессией ANGPTL3. В любом случае курирующий врач может корректировать количество и временные рамки введения iRNA, исходя из результатов, наблюдаемых при использовании стандартных средств измерения эффективности, известных из уровня техники или описанных в данном документе.

VI. Способы по настоящему изобретению

Настоящее изобретение также предусматривает способы применения iRNA по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей iRNA по настоящему изобретению, для снижения и/или ингибирования экспрессии ANGPTL3 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с dsRNA по настоящему изобретению и выдерживание клетки в течение времени, достаточного для достижения разрушения мРНК-транскрипта гена ANGPTL3, за счет чего осуществляется ингибирование экспрессии гена ANGPTL3 в клетке. Снижение экспрессии гена можно оценивать с помощью любых способов, известных из уровня техники. Например, снижение экспрессии ANGPTL3 можно определить путем определения уровня экспрессии мРНК ANGPTL3 с применением способов, обычных для среднего специалиста в данной области, например, нозерн-блоттинга, qRT-PCR; путем определения уровня белка ANGPTL3 с помощью способов, обычных для среднего специалиста в данной области, таких как вестерн-блоттинг, иммунологические методики. Снижение экспрессии ANGPTL3 также можно оценить опосредованно путем измерения уменьшения биологической активности ANGPTL3, например, уменьшения уровня липидов сыворотки крови, триглицеридов, холестерина и/или свободных жирных кислот.

В способах по настоящему изобретению клетку можно приводить в контакт *in vitro* или *in vivo*, т. е. клетка может находиться в организме субъекта.

Клеткой, подходящей для лечения с помощью способов по настоящему изобретению, может быть любая клетка, которая экспрессирует ген ANGPTL3. Клетка, подходящая для применения в способах по настоящему изобретению, может представлять собой клетку млекопитающего, например, клетку примата (такую как клетка человека или клетка отличного от человека примата, например, клетка обезьяны или клетка шимпанзе), клетку отличного от примата млекопитающего (такую как клетка коровы, клетка свиньи, клетка верблюда, клетка ламы, клетка лошади, клетка козы, клетка кролика, клетка овцы, клетка хомяка, клетка морской свинки, клетка кошки, 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, например, клетку печени человека.

Экспрессия ANGPTL3 ингибируется 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, 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%. В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия ANGPTL3 ингибируется по меньшей мере на 20%.

Способы *in vivo* по настоящему изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей iRNA, где iRNA содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную по меньшей мере части РНК-транскрипта гена ANGPTL3 млекопитающего, подлежащего лечению. Если организм, который подлежит лечению, является млекопитающим, таким как человек, то композицию можно вводить любым способом, известным из уровня техники, в том числе без ограничения с помощью перорального, внутрибрюшинного или

парентерального пути, в том числе посредством интракраниального (например, интравентрикулярного, интрапаренхиматозного и интратекального), внутривенного, внутримышечного, подкожного, трансдермального введения, введения в дыхательные пути (аэрозольного), назального, ректального и местного (в том числе трансбуккального и сублингвального) введения. В определенных вариантах осуществления композиции вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. В определенных вариантах осуществления композиции вводят путем подкожной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством инъекции депо-препарата. iRNA может устойчивым образом высвобождаться из инъекционного депо-препарата в течение длительного периода времени. Таким образом, при инъекции депо-препарата можно снизить частоту введения доз, необходимых для достижения желаемого эффекта, например, желаемого ингибирования ANGPTL3 или терапевтического или профилактического эффекта. Инъекция депо-препарата может также обеспечивать более устойчивые концентрации в сыворотке крови. Инъекции депо-препарата могут включать в себя 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 являться 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 подкожным инфузионным насосом. В других вариантах осуществления насос является насосом, имплантируемым хирургическим путем, который доставляет iRNA в печень.

Способ введения можно выбрать, исходя из того, локальное или системное лечение является необходимым, и исходя из области, подлежащей обработке. Путь и место введения можно выбрать для

усиления целенаправленного воздействия.

В одном аспекте настоящее изобретение также предусматривает способы ингибирования экспрессии гена ANGPTL3 у млекопитающего. Способы включают введение млекопитающему композиции, содержащей dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген ANGPTL3 в клетке млекопитающего, и выдерживание млекопитающего в течение времени, достаточного для достижения разрушения мРНК-транскрипта гена ANGPTL3, за счет чего осуществляется ингибирование экспрессии гена ANGPTL3 в клетке. Снижение экспрессии гена можно оценивать с помощью любых способов, известных из уровня техники, и с помощью способов, например, qRT-PCR, описанных в данном документе. Снижение выработки белка можно оценивать с помощью любых способов, известных из уровня техники, и с помощью способов, например, ELISA, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления полученный путем пункции биоптат печени служит в качестве тканевого материала для контроля снижения экспрессии гена и/или белка ANGPTL3.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способы лечения субъекта, нуждающегося в этом. Способы лечения по настоящему изобретению включают введение iRNA по настоящему изобретению субъекту, например, субъекту, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии ANGPTL3, в терапевтически эффективном количестве iRNA, целенаправленно воздействующей на ген ANGPTL3, или фармацевтической композиции, содержащей iRNA, целенаправленно воздействующую на ген ANGPTL3.

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

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

Субъектами, на которых будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена ANGPTL3, являются субъекты, имеющие нарушение метаболизма липидов, например, наследственное нарушение метаболизма липидов или приобретенное нарушение метаболизма липидов. В одном варианте осуществления субъект, имеющий нарушение метаболизма липидов, имеет гиперлипидемию. В другом варианте осуществления субъект, имеющий нарушение метаболизма липидов, имеет гипертриглицеридемию. Лечение субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена ANGPTL3, включает в себя терапевтическое лечение (например, у субъекта, имеющего эруптивные ксантомы) и профилактическое лечение (например, у субъекта, не имеющего эруптивных ксантом, или у субъекта, который может быть подвержен риску развития эруптивных ксантом).

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способы применения iRNA или фармацевтической композиции на ее основе, например, для лечения субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии ANGPTL3, например, субъекта, имеющего нарушение метаболизма липидов, в комбинации с другими фармацевтическими препаратами и/или другими способами терапии, например, с известными фармацевтическими препаратами и/или известными способами терапии, такими как, например, те, которые в настоящее время используются для лечения этих нарушений. Например, в определенных вариантах осуществления iRNA, целенаправленно воздействующую на ANGPTL3, вводят в комбинации, например, со средством, применимым при лечении нарушения метаболизма липидов, как описано в других местах в данном документе. Например, дополнительные средства, подходящие для лечения субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии ANGPTL3, например, у субъекта, имеющего нарушение метаболизма липидов, могут включать в себя средства, снижающие

уровень одного или нескольких липидов сыворотки крови. Неограничивающие примеры таких средств могут включать в себя ингибиторы синтеза холестерина, такие как ингибиторы HMG-CoA-редуктазы, например, статины. Статины могут включать в себя аторвастатин (липитор), флувастатин (лескол), ловастатин (мевакор), ловастатин с пролонгированным высвобождением (алтопрев), питавастатин (ливало), правастатин (правахол), розувастатин (крестор) и симвастатин (зокор). Другие средства, применимые в лечении нарушения метаболизма липидов, могут включать в себя секвестранты желчных кислот, такие как холестирамин и другие смолы; ингибиторы секреции VLDL, такие как ниацин; липофильные антиоксиданты, такие как пробукол; ингибиторы ацил-CoA-холестеринацилтрансферазы; антагонисты фарнезоидного X-рецептора; активаторы белка, активирующего расщепление белков, связывающихся со стеролрегулирующими элементами (SCAP); ингибиторы микросомального белка-переносчика триглицеридов (MTP); ApoE-родственный пептид и терапевтические антитела к ANGPTL3. Дополнительные терапевтические средства также могут включать в себя средства, повышающие уровень липопротеинов высокой плотности (HDL), такие как ингибиторы белка-переносчика холестеридовых эфиров (CETP). Кроме того, дополнительные терапевтические средства также могут включать в себя пищевые добавки, например, рыбий жир. iRNA и дополнительные терапевтические средства можно вводить в одно и то же время и/или в одной и той же комбинации, например, парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить в качестве части отдельной композиции, или в отделенные моменты времени, и/или с помощью другого способа, известного из уровня техники или описанного в данном документе.

В одном варианте осуществления способ включает введение композиции, представленной в данном документе, так, чтобы экспрессия гена-мишени ANGPTL3 уменьшалась, как, например, на приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 18, 24 часа, 28, 32 или приблизительно 36 часов. В одном варианте осуществления экспрессия гена-мишени ANGPTL3 уменьшается на длительный срок, например, по меньшей мере на приблизительно два, три, четыре дня

или дольше, например, на приблизительно одну неделю, две недели, три недели или четыре недели или дольше.

iRNA, применимые для способов и композиций, представленных в данном документе, предпочтительно осуществляют специфичное целенаправленное воздействие на РНК (первичные или процессированные) гена-мишени ANGPTL3. Композиции и способы для ингибирования экспрессии этих генов с помощью iRNA можно получать и осуществлять согласно описанному в данном документе.

Введение dsRNA в соответствии со способами по настоящему изобретению может в результате приводить к снижению тяжести, интенсивности проявлений признаков и симптомов и/или уровней маркеров таких заболеваний или нарушений у пациента с нарушением метаболизма липидов. Под "снижением" в данном контексте подразумевают 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, качества жизни, дозы лекарственного препарата, необходимой для выдерживания эффекта лечения, уровня маркера заболевания или любого другого измеряемого параметра, соответствующего данному 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 нарушения метаболизма липидов можно оценивать, например, путем периодического контроля уровней одного или нескольких липидов сыворотки крови. Сравнение поздних показаний с начальными показаниями обеспечивает врача показаниями, 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. Применительно к введению iRNA, целенаправленно воздействующей на ANGPTL3, или фармацевтической композиции на ее основе "эффективной против" нарушения метаболизма липидов указывает на то, что введение клинически приемлемым способом по меньшей мере у статистически значимой доли пациентов приводит в результате к благоприятному эффекту, такому как улучшение симптомов, излечение, снижение тяжести заболевания, увеличение продолжительности жизни, улучшение качества жизни, или другому эффекту, обычно считающемуся положительным врачами, знакомыми с лечением нарушения метаболизма липидов и связанными с этим причинами.

Лечебный или предупредительный эффект является очевидным, когда наблюдается статистически значимое улучшение одного или нескольких параметров болезненного состояния, или по отсутствию усугубления или развития симптомов в тех случаях, когда их, при иных обстоятельствах, прогнозировали. В качестве примера, 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 может служить показателем эффективного лечения. 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, когда наблюдают статистически значимое снижение маркера или ослабление симптома.

В качестве альтернативы, эффективность можно измерять по уменьшению тяжести заболевания, как определено специалистом в области техники, связанной с диагностикой, исходя из принятой в клинической практике шкалы оценивания тяжести заболевания, например, в качестве одного примера, показатель по шкале Чайльда-Пью (в некоторых случаях показатель по шкале Чайльда-Туркотта-Пью). Любое позитивное изменение, приводящее, например, к уменьшению тяжести заболевания, оцениваемому с использованием соответствующего масштаба, представляет адекватное лечение с применением иРНК или состава, представляющего собой иРНК, как

описано в данном документе.

Субъектам можно вводить терапевтическое количество dsRNA, как, например, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. 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.

iRNA можно вводить путем внутривенной инфузии в течение некоторого периода времени на регулярной основе. В определенных вариантах осуществления после выполнения режима начального лечения лекарственные препараты можно вводить с меньшей частотой. Посредством введения iRNA можно снизить уровни ANGPTL3, например, в клетке, ткани, крови, моче или другом компартменте 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, 39, 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. В предпочтительном варианте осуществления посредством введения iRNA можно снизить уровни ANGPTL3, например, в клетке, ткани, крови, моче или другом компартменте пациента, по меньшей мере на 20%.

Перед введением полной дозы iRNA пациентам можно вводить меньшую дозу, такую как 5% доза для выявления инфузионных реакций, и контролировать у них неблагоприятные эффекты, такие как аллергическая реакция. В другом примере пациента можно наблюдать в отношении нежелательных иммуностимулирующих эффектов, как, например, повышенных уровней цитокина (например, TNF-альфа или INF-альфа).

В качестве альтернативы, iRNA можно вводить подкожно, т. е. путем подкожной инъекции. Для доставки желаемой суточной дозы iRNA субъекту можно использовать одну или несколько инъекций. Инъекции можно повторять в течение некоторого периода времени. Введение можно повторять на регулярной основе. В определенных

вариантах осуществления после выполнения режима начального лечения лекарственные препараты можно вводить с меньшей частотой. Режим повторных доз может предусматривать введение терапевтического количества iRNA на регулярной основе, как, например, раз в два дня или 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 в три месяца).

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

ПРИМЕРЫ

1. Пример 1. Конструирование, синтез, отбор и оценивание *in vitro* iRNA

2. В данном примере описаны способы конструирования, синтеза, отбора и оценивания *in vitro* средств на основе iRNA против ANGPTL3 (также см. РСТ-публикацию WO 2012/177784, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки).

3.

4. Источники получения реагентов

Если источник получения реагента конкретно не приведен в данном документе, такой реагент можно получать от любого поставщика реагентов для использования в молекулярной биологии

со стандартными качеством/чистотой для применения в молекулярной биологии.

Набор siRNA, целенаправленно воздействующих на ANGPTL3, "ангиопоэтин-подобный белок 3" (человек: RefSeqID NCBI NM_014995; GeneID NCBI 27329), а также на ортологи ANGPTL3 в исследованиях видовой токсичности (макак-крабод: XM_005543185; мышь: NM_013913; крыса: NM_001025065) конструировали с помощью специально разработанных скриптов R и Python. мРНК ANGPTL3 человека в RefSeq имеет длину 2951 основание. Логическое обоснование и способ применения набора конструкций siRNA заключались в следующем: прогнозируемую эффективность для каждой потенциальной 19-мерной siRNA от положения 81 до положения 2951 включительно (кодирующий участок и 3'-UTR) определяли с помощью линейной модели, в которой получали непосредственную меру нокдауна мРНК в результате воздействия более чем 20000 различных конструкций siRNA, целенаправленно воздействующих на большое количество генов позвоночных. Поднаборы siRNA против ANGPTL3 конструировали с идеальными или почти идеальными совпадениями между человеком, макаком-крабодом и макаком-резусом. Дополнительный поднабор конструировали с идеальными или почти идеальными совпадениями с ортологами ANGPTL3 мыши или крысы. Для каждой нити siRNA в полном переборе использовали сделанный по индивидуальному заказу скрипт Python для измерения количества и определения положений ошибок спаривания между siRNA и всеми потенциальными выравниваниями в транскрипте 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. Относительный балл за ошибки спаривания составлял 2,8; 1,2: 1 для ошибок спаривания в затравочном участке, сайте расщепления и 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 ANPTL3.

Синтез последовательностей ANGPTL3

Синтез отдельных нитей и дуплексов ANGPTL3

Последовательности siRNA против ANGPTL3 синтезировали в масштабе 1 мкмоль на синтезаторе Mermade 192 (BioAutomation) с применением фосфорамидитной химии при помощи твердой подложки. Твердая подложка представляла собой стеклянную подложку с регулируемыми порами (500 °Å), нагруженную сделанным по индивидуальному заказу лигандом GalNAc, или универсальную твердую подложку (AM biochemical). Вспомогательные реагенты для синтеза, 2'-F- и 2'-O-метил-РНК и дезоксо-фосфорамидиты, получали от Thermo-Fisher (Милуоки, Висконсин) и HONGGENE (Китай). 2'-F, 2'-O-метил, РНК, ДНК и другие модифицированные нуклеозиды вводили в последовательности с применением 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 антисмысловых отдельных нитей. Время связывания для всех фосфорамидитов (100 мМ в ацетонитриле) составляло 5 мин. при использовании 5-этилтио-1Н-тетразола (ETT) в качестве активатора (0,6 М в ацетонитриле). Фосфотиоатные связи получали с применением 50 мМ раствора 3-(диметиламинометилиден)амино-3Н-1,2,4-дитиазол-3-тиона (DDTT, полученный от Chemgenes (Уилмингтон, Массачусетс, США) в безводном ацетонитриле/пиридине (1:1 об./об.)). Время окисления составляло 3 минуты. Все последовательности синтезировали с удалением в конечном итоге группы DMT ("без DMT").

После завершения твердофазного синтеза отдельные нити отщепляли от твердой подложки, и с них удаляли защитные группы в запечатанных планшетах с 96 глубокими лунками с использованием 200 мкл реагента, представляющего собой водный метиламин, при

60°C в течение 20 минут. Для последовательностей, содержащих 2'-рибозные остатки (2'-OH), которые были защищены группой трет-бутилдиметилсилила (TBDMS), вторую стадию снятия защиты выполняли с применением реагента TEA.3HF (триэтиламина тригидрофторида). К раствору метиламина для удаления защитных групп добавляли 200 мкл диметилсульфоксида (DMSO) и 300 мкл реагента TEA.3HF, и раствор инкубировали в течение дополнительных 20 минут при 60°C. В конце стадии отщепления и удаления защитных групп планшету для синтеза позволяли 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 надосадочную жидкость осторожно сливали с помощью 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 ANGPTL3 осуществляли на автоматическом устройстве Tecan для манипуляции с жидкостями. Эквимольную смесь смысловых и антисмысловых отдельных нитей объединяли и гибридизовали в 96-луночных планшетах. После объединения комплементарных отдельных нитей 96-луночный планшет плотно запечатывали, и нагревали в печи при 100°C в течение 10 минут, и позволяли медленно достичь комнатной температуры в течение периода 2-3 часа. Концентрацию каждого дуплекса нормализовали по 10 мкМ в 1X PBS и затем подвергали скрининговым анализам *in vitro*.

Таблица 1. Сокращения нуклеотидных мономеров, используемые в представлении последовательности нуклеиновой кислоты.

Следует понимать, что эти мономеры, если они присутствуют в олигонуклеотиде, связаны между собой 5'-3'-фосфодиэфирными связями.

Сокращение	Нуклеотид (Нуклеотиды)
A	Аденозин-3'-фосфат
Af	2'-Фторадеозин-3'-фосфат
Afs	2'-Фторадеозин-3'-фосфотиоат
As	Аденозин-3'-фосфотиоат
C	Цитидин-3'-фосфат
Cf	2'-Фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-Фторцитидин-3'-фосфотиоат
Cs	Цитидин-3'-фосфотиоат
G	Гуанозин-3'-фосфат
Gf	2'-Фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-Фторгуанозин-3'-фосфотиоат
Gs	Гуанозин-3'-фосфотиоат
T	5'-Метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-Фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-Фтор-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
Ts	5-Метилуридин-3'-фосфотиоат
U	Уридин-3'-фосфат
Uf	2'-Фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-Фторуридин-3'-фосфотиоат
Us	Уридин-3'-фосфотиоат
N	Любой нуклеотид (G, A, C, T или U)
a	2'-О-Метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-О-Метиладенозин-3'-фосфотиоат
c	2'-О-Метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-О-Метилцитидин-3'-фосфотиоат
g	2'-О-Метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-О-Метилгуанозин-3'-фосфотиоат
t	2'-О-Метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-Метил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
u	2'-О-Метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-Метилуридин-3'-фосфотиоат
s	фосфотиоатная связь
L96	N- [трис (GalNAc-алкил) -амидодеканоил] -4-гидроксипролинол-Нур- (GalNAc-алкил) 3
dT	2'-Дезокситимидин-3'-фосфат

Сокращение	Нуклеотид (Нуклеотиды)
dC	2`-Дезоксицитидин-3`-фосфат
Y44	Инвертированный нуклеотид ДНК, лишенный азотистого основания (2-гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат)
(Tgn)	Тимидин-глицоль-нуклеиновая кислота (GNA), S-изомер
P	Фосфат
VP	Винилфосфат
(Aam)	2`-O- (N-метилацетамид) аденозин-3`-фосфат
(Aams)	2`-O- (N-метилацетамид) аденозин-3`-фосфотиоат
(Cgn)	Цитидин-глицоль-нуклеиновая кислота (GNA)

Пример 2. Отбор и оценивание лидерных молекул

На основании результатов различных анализов *in vitro* и *in vivo* (см. РСТ-публикацию WO 2012/177784, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки), исходные последовательности AD-52981 (смысловая последовательность: ACAUAAUUGAUCAGUCUUUUU (SEQ ID NO: 20); антисмысловая последовательность: AAAAAGACUGAUCAAAUAUGUUG) (SEQ ID NO: 21) отбирали для модификации и дополнительного оценивания *in vivo*.

Таким образом, с применением исходных последовательностей AD-52981 синтезировали AD-57927 (смысловая последовательность: AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96 (SEQ ID NO: 70); антисмысловая последовательность: asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug) (SEQ ID NO: 71) согласно описанному выше.

Эффект AD-57927 *in vivo* оценивали посредством подкожного введения самкам мышей C57BL/6 одной дозы 30, 10 или 3 мг/кг AD-52981 (смысловая последовательность: AfcAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96 (SEQ ID NO: 72); антисмысловая последовательность: aAfaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusUfsg) (SEQ ID NO: 73), AD-57927 или контрольного PBS. Через 72 часа после введения дозы животных умерщвляли, и определяли уровни мРНК ANGPTL3 в печени. На удивление, и как показано на фигуре 1, AD-57927 ("оптимизированный ANG-GalNAc") обеспечивал приблизительно в 10 раз более значительное уменьшение уровней мРНК ANGPTL3, чем исходное средство на основе iRNA AD-52981 ("ANG-GalNAc").

Способность AD-57927 к подавлению экспрессии белка ANGPTL3 и к снижению уровней триглицеридов, холестерина LDL и общего холестерина *in vivo* также оценивали с применением многодозового режима. Самкам мышей ob/ob подкожно вводили AD-57927 при 3 мг/кг каждый день в течение 5 дней в неделю 1, а затем дозу 3 мг/кг два раза в неделю в недели 2-4 (qd x 5; qw x 6). У животных отбирали кровь в дни 0, 4, 8, 11, 15, 18, 22 и 25, и их умерщвляли в день 29. Уровни белка ANGPTL3 измеряли с помощью ELISA. Уровни триглицеридов, холестерина LDL и общего холестерина измеряли с помощью анализатора сыворотки крови Olympus. Как показано на фигуре 2, максимальный нокдаун белка ANGPTL3 под действием AD-57927 составлял 99%. Максимальное снижение уровней триглицеридов под действием AD-57927 составляло 98% (фигура 3), максимальное снижение уровня LDL под действием AD-57927 составляло 88% (фигура 4), и максимальное снижение уровня общего холестерина под действием AD-57927 составляло 64% (фигура 5). Все данные, представленные на фигурах 2-5, приведены относительно уровней до приема дозы.

Вкратце, было продемонстрировано, что AD-57927 обеспечивает приблизительно в 10 раз более значительное снижение уровней мРНК ANGPTL3, чем исходная последовательность. Также было продемонстрировано, что AD-57927 обеспечивает снижение уровня ANGPTL3 дозозависимым образом (см. фигуру 1), и эффективность AD-57927 дополнительно улучшалась при введении нескольких доз, что в результате приводило к более чем 95% снижению уровня сывороточного белка ANGPTL3 в модели смешанной гиперлипидемии на мышцах ob/ob. Кроме того, введение нескольких доз AD-57927 при 3 мг/кг обеспечивало устранение циркулирующего сывороточного белка ANGPTL3 согласно измерениям в ходе ANGPTL3-специфического анализа ELISA, что приводило к > 95% снижению уровней TG, > 85% снижению уровня холестерина LDL и > 60% снижению уровня общего холестерина в модели гиперлипидемии на мышцах ob/ob.

5. Пример 3. Конструирование, синтез, отбор и оценивание *in vitro* iRNA

В данном примере описаны способы конструирования, синтеза, отбора и оценивания *in vitro* дополнительных средств на основе

iRNA против ANGPTL3.

Скрининг *in vitro*

Культура клеток и трансфекции:

Клетки Нер3В (АТСС, Манассас, Вирджиния) выращивали до почти полной конfluence при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в минимальной поддерживающей среде Игла (Gibco), дополненной 10% FBS (АТСС), перед отделением от чашки Петри путем обработки трипсином. Трансфекцию выполняли 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 каждого дуплекса siRNA в отдельной лунке в 384-луночной планшете. Смесь затем инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут. 40 мкл полных питательных сред, содержащих 5000 клеток Нер3В, затем добавляли к смеси siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 ч. перед очисткой РНК. Эксперименты в отношении разовой дозы выполняли при конечной концентрации дуплекса 10 нМ и 0,1 нМ.

Выделение общей РНК с использованием набора DYNABEADS mRNA Isolation Kit (Invitrogen, № по кат. 610-12):

Клетки лизировали в 75 мкл лизирующего/связывающего буфера, содержащего 3 мкл гранул на лунку, и перемешивали в течение 10 минут на электростатическом встряхивателе. Стадии промывания проводили в автоматическом режиме с помощью Biotek EL406, используя магнитный держатель для планшетов. Гранулы промывали (90 мкл) однократно буфером А, однократно буфером В и двукратно буфером Е со стадиями аспирации между промывками. После заключительной аспирации в каждую лунку добавляли 10 мкл полной смеси для RT, как описано ниже.

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

В каждую лунку добавляли мастер-микс из 1 мкл 10X буфера, 0,4 мкл 25X dNTP, 1 мкл случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 6,6 мкл H₂O на реакцию. Планшеты запечатывали, встряхивали в течение 10 минут

на электростатическом встряхивателе, а затем инкубировали при 37°C в течение 2 часов. После этого планшеты встряхивали при 80°C в течение 8 минут.

ПЦР в режиме реального времени

К мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH человека (4326317E), 0,5 мкл ANGPTL3 человека (Hs00205581_m1), 2 мкл воды без нуклеаз и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № по каталогу 04887301001) на лунку в 384-луночных планшетах (Roche, № по каталогу 04887301001), добавляли 2 мкл кДНК. ПЦР в режиме реального времени выполняли на системе LightCycler480 для ПЦР в режиме реального времени (Roche) с применением анализа по $\Delta\Delta C_t$ (RQ)-методу. Каждый дуплекс тестировали по меньшей мере при двух независимых трансфекциях, если в сводных таблицах не указано иное.

Для расчета относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с применением $\Delta\Delta C_t$ -способа и нормализовали по таковым в анализах, осуществляемых с клетками, трансфицированными 10 нМ неспецифической siRNA, или клетками, подвергнутыми ложной трансфекции.

Тестировали ряд iRNA против ANGPTL3, содержащих различные химические модификации на основе смысловой последовательности 5'-ACAUAUUUGAUCAGUCUUUUU-3' (SEQ ID NO: 20) и антисмысловой последовательности 5'-AAAAAGACUGAUCAAUAUGUUG-3' (SEQ ID NO: 21). Химические модификации последовательностей показаны в таблицах 2А и 2В. Результаты анализов показаны в таблице 3.

Дополнительные средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующие на ген ANGPTL3, синтезировали согласно описанному выше. Подробный перечень дополнительных модифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей для ANGPTL3 показан в таблицах 4А, 4В, 7А и 7В, а подробный перечень немодифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей для ANGPTL3 показан в таблицах 5 и 7С.

Таблица 2А. Модифицированные последовательности ANGPTL3

Название дуплекса	Смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO
AD-57927	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	74	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	170
AD-63131	ascsauauuugaUfCfagucuuuuuL96	75	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	171
AD-63132	ascsauauuugadTdCagucuuuuuL96	76	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	172
AD-63133	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	77	asAfsaAfagaCfuGfaucAfaAfuAfugusug	173
AD-63134	ascsauaUfuUgfaUfCfagUfCfuuuuuL96	78	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuaugusug	174
AD-63136	Y44AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	79	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	175
AD-63137	ascsauauUfuGfAfUfcaguCfuudTuuL96	80	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	176
AD-63138	ascsauauuugadTcagucuuuuuL96	81	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	177
AD-63139	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	82	asAfsaAfagaCfugaucAfaAfuAfugusug	178
AD-63140	ascsauaUfuugaUfcagucuuuuuL96	83	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuaugusug	179
AD-63142	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	84	PasAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	180
AD-63143	ascsauauUfuGfAfUfcaguCfdTuuuuL96	85	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	181
AD-63144	ascsauauuugadTcaguc (Tgn) uuuuL96	86	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	182
AD-63145	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	87	asAfsaAfagacuGfaucAfaAfuAfugusug	183
AD-63146	ascsauaUfuUgfaUfCfagUfCfuudTuuL96	88	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuaugusug	184
AD-63148	Y44AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	89	PasAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	185
AD-63149	ascsauauUfuGfAfdTcaguCfuuuuuL96	90	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	186
AD-63150	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	91	asAfsaAfaGfacuGfaucAfaAfuAfuGfusug	187
AD-63151	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	92	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuaugusug	188
AD-63152	ascsauaUfuUgfaUfCfagUfCfdTuuuuL96	93	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuaugusug	189
AD-63153	asusAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	94	PasAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfusgsu	190
AD-63154	ascsauaUfuugAfUfcAfguCfuuuuuL96	95	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	191
AD-63155	ascsauaUfuugaUfcagucudTuuL96	96	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	192
AD-63156	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	97	asAfsaaaGfaCfuGfaucAfaAfuaugfusug	193
AD-63157	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	98	asAfsaaaGfacugaucAfaAfuaugusug	194
AD-63158	ascsauaUfuUgfaUfCfagUfCfuuuuuL96	99	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuaugusug	195
AD-63160	ascsauauUfuGfAfUfcaguCfuuuuuL96	100	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	196
AD-63161	ascsauaUfuugaUfcagucdTuuuuL96	101	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	197

Название дуплекса	Смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO
AD-63162	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	102	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuaugusug	198
AD-63163	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	103	asAfsaaaGfaCfuGfaucAfaAfuaugusug	199
AD-63164	ascsauaUfuugaUfcagucuuuL96	104	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuaugusug	200
AD-63165	ascsauaUfuUGfaUfcfagUfcUfuuuuuL96	105	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	201
AD-63166	ascsauaUfuugaUfdCagucuuuuuL96	106	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	202
AD-63167	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	107	asAfsaaaGfacuGfaucAfaAfuaugusug	203
AD-63168	ascsauaUfuugAfUfcAfgUfcUfuuuuuL96	108	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuaugusug	204
AD-63169	ascsauaUfuugaUfcagucdTuuuuL96	109	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuaugusug	205
AD-63170	ascsAfuAfuuuGfAfUfcAfgUfcUfuuuuuL96	110	asAfsAfaaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	206
AD-63171	ascsauaUfuugaUfcagucuuuuuL96	111	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	207
AD-63172	ascsauuuugaUfdCagucuuuuuL96	112	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	208
AD-63173	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	113	asAfsaaaGfaCfuGfaucAfaAfuaugusug	209
AD-63174	ascsauauUfuGfAfUfcagucUfuuuuuL96	114	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuaugusug	210
AD-63175	ascsauaUfuugaUfdCagucuuuuuL96	115	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuaugusug	211
AD-63176	ascsAfuAfuuuGfAfUfcAfgUfcUfuuuuuL96	116	asAfsAfaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	212
AD-63177	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	117	asAfsa (Aam) aGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	213
AD-63179	ascsAfuAfuuuGfAfUfcAfgUfcUfuuuuuL96	118	asAfsAfaaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	214
AD-63180	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	119	as (Aams) aAfaGfaCfuGfaucAfaAfu (Aam) uGfusug	215
AD-63181	ascsAfuAfuuuGfAfUfcAfgUfcUfuuuuuL96	120	asAfsAfaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	216
AD-63182	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	121	asAfsa (Aam) aGfaCfuGfaucAfaAfu (Aam) uGfusug	217
AD-63183	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	122	asasaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	218
AD-63185	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	123	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	219
AD-63186	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	124	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	220
AD-63187	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	125	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	221
AD-63188	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	126	as (Aams) aAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	222
AD-64744	ascsauuuugadTcagucdTuuuuL96	127	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	223
AD-64745	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	128	asAfsaaaGfacuGfaucAfaaauaugusug	224
AD-64746	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	129	asdAsaaagacugaucdAadAuaugusug	225
AD-64747	ascsauuuuGfaUfcagUfcuuUfuL96	130	asAfsaaaGfacuGfaucAfaAfuaugusug	226

Название дуплекса	Смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO
AD-64748	ascsauauuugadTcagucdAuuuuL96	131	asdAsaaagacudGaucdAaauaugusug	227
AD-64749	ascsauauuuGfaUfcagUfcuuUfuuL96	132	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	228
AD-64750	ascsauauuugadTdCagucdTuuuuL96	133	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	229
AD-64751	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	134	asdAsaaadGacudGaucdAaauaugusug	230
AD-64752	ascsauauuuGfaUfcagUfcuuuuuL96	135	asAfsaaaGfacuGfaucAfaAfuaugusug	231
AD-64753	ascsauauuugadTcagucdAuuuuL96	136	asdAsaaadGacugaucdAaauaugusug	232
AD-64754	ascsauauuuGfaUfcagUfcuuuuuL96	137	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	233
AD-64755	ascsauauuugadTdCagucdCuuuuL96	138	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	234
AD-64756	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	139	asAfsaaagacugaucAfaauaugusug	235
AD-64757	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	140	asAsaaagacudGaucdAaauaugusug	236
AD-64758	ascsauauuuGfaUfcagUfcuuUfuuL96	141	asAfsaaaGfacUfGfaucAfaAfuaugusug	237
AD-64759	ascsauauuugadTcagucdAuuuuL96	142	asdAsaaadGacudGaucdAaauaugusug	238
AD-64760	ascsauauuuuadTcagucuuuuuL96	143	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	239
AD-64761	ascsauauuugadTcagucdGuuuuL96	144	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	240
AD-64762	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	145	asdAsaaagacugaucdAaauaugusug	241
AD-64763	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	146	asdAsaaagacudGaucAaauaugusug	242
AD-64764	ascsauauuuGfaUfcagUfcuuuuuL96	147	asAfsaaaGfacUfGfaucAfaAfuaugusug	243
AD-64765	ascsauauuugaUcaguc (Tgn) uuuuL96	148	asdAsaaagacudGaucdAaauaugusug	244
AD-64766	ascsauauuugadTcagu (Cgn) uuuuuL96	149	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	245
AD-64767	ascsauauuugadTcagucdCuuuuL96	150	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	246
AD-64768	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	151	asasaaagacudGaucdAaauaugusug	247
AD-64769	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	152	asAsaaagacudGaucAaauaugusug	248
AD-64770	ascsauauuugadTcaguc (Tgn) uuuuL96	153	asdAsaaagacudGaucdAaauaugusug	249
AD-64771	ascsauauuugaUcaguc (Tgn) uuuuL96	154	asdAsaaadGacugaucdAaauaugusug	250
AD-64772	ascsauauuugadTcagucdAuuuuL96	155	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	251
AD-64773	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	156	asasaaadGacugaucdAaauaugusug	252
AD-64774	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	157	asAsaaadGacugaucAaauaugusug	253
AD-64775	ascsauauuugadTcaguc (Tgn) uuuuL96	158	asdAsaaadGacugaucdAaauaugusug	254
AD-64776	ascsauauuugaUcaguc (Tgn) uuuuL96	159	asdAsaaadGacudGaucdAaauaugusug	255

Название дуплекса	Смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO
AD-64777	ascsauauuugadTcaguc (Tgn) uuuL96	160	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	256
AD-64778	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	161	asAfsaaaGfacuGfaucAfaAfuaugusug	257
AD-64779	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	162	asdAsaaagacudGaucdAaauaugusug	258
AD-64780	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	163	PasdAsaaagacudGaucdAaauaugusug	259
AD-64781	ascsauauuugadTcaguc (Tgn) uuuuL96	164	asdAsaadGacudGaucdAaauaugusug	260
AD-64782	ascsauauuugaUcaguc (Tgn) uuuuL96	165	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	261
AD-64783	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	166	asAfsaaaGfacUfGfaucAfaAfuaugusug	262
AD-64784	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	167	asdAsaadGacugaucdAaauaugusug	263
AD-64785	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	168	PasasaaagacudGaucdAaauaugusug	264
AD-64786	ascsauauuugadTcaguc (Tgn) uuuuL96	169	PasdAsaaagacudGaucdAaauaugusug	265

Таблица 2В. Модифицированные последовательности ANGPTL3

Название дуплекса	Смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO
AD-57927	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	74	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	170
AD-63131	ascsauauuugaUfCfagucuuuuu	75	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	171
AD-63132	ascsauauuugadTdCagucuuuuu	76	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	172
AD-63133	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	77	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	173
AD-63134	ascsauaUfuUgfaUfCfagUfCfuuuuu	78	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuauugusug	174
AD-63136	Y44AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	79	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	175
AD-63137	ascsauauUfuGfAfUfcaguCfuudTuu	80	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	176
AD-63138	ascsauauuugadTcagucuuuuu	81	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	177
AD-63139	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	82	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	178
AD-63140	ascsauaUfuugaUfcagucuuuuu	83	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuauugusug	179
AD-63142	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	84	PasAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	180
AD-63143	ascsauauUfuGfAfUfcaguCfdTuuuu	85	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	181
AD-63144	ascsauauuugadTcaguc (Tgn) uuuu	86	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	182
AD-63145	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	87	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	183
AD-63146	ascsauaUfuUgfaUfCfagUfCfuudTuu	88	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuauugusug	184
AD-63148	Y44AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	89	PasAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	185
AD-63149	ascsauauUfuGfAfUfcaguCfuuuuu	90	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	186
AD-63150	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	91	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	187
AD-63151	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	92	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuauugusug	188
AD-63152	ascsauaUfuUgfaUfCfagUfCfdTuuuu	93	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuauugusug	189
AD-63153	asusAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	94	PasAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	190
AD-63154	ascsauaUfuugAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	95	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	191
AD-63155	ascsauaUfuugaUfcagucuuudTuu	96	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	192
AD-63156	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	97	asAfsaaaGfaCfuGfaucAfaAfuauGfusug	193
AD-63157	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	98	asAfsaaaGfacugaucAfaAfuauugusug	194
AD-63158	ascsauaUfuUgfaUfCfagUfCfuuuuu	99	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuauugusug	195
AD-63160	ascsauauUfuGfAfUfcaguCfuuuuu	100	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	196
AD-63161	ascsauaUfuugaUfcagucdTuuuu	101	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	197

Название дуплекса	Смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO
AD-63162	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	102	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuangusug	198
AD-63163	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	103	asAfsaaaGfaCfUfgaucAfaAfuangusug	199
AD-63164	ascsauaUfuugaUfcagucudTuu	104	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuangusug	200
AD-63165	ascsauaUfuUGfaUfCfagUfCfuuuuu	105	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	201
AD-63166	ascsauaUfuugaUfdCagucuuuuu	106	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	202
AD-63167	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	107	asAfsaaaGfacuGfaucAfaAfuauGfusug	203
AD-63168	ascsauaUfuugAfUfcAfguCfuuuuu	108	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuangusug	204
AD-63169	ascsauaUfuugaUfcagucdTuuuu	109	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuangusug	205
AD-63170	ascsAfuAfuuuGfAfUfcAfguCfUfuuuu	110	asAfsAfaaGfaCfuGfaucAfAfAfuAfuGfusug	206
AD-63171	ascsauaUfuugaUfcagucuuuuu	111	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	207
AD-63172	ascsauauuugaUfdCagucuuuuu	112	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	208
AD-63173	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	113	asAfsaaaGfaCfuGfaucAfaAfuangusug	209
AD-63174	ascsauauUfuGfAfUfcaguCfuuuuu	114	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuangusug	210
AD-63175	ascsauaUfuugaUfdCagucuuuuu	115	asAfsaaaGfacUfgaucAfaAfuangusug	211
AD-63176	ascsAfuAfuuuGfAfUfcAfguCfUfuuuu	116	asAfsAfAfaGfaCfuGfaucAfAfAfuAfuGfusug	212
AD-63177	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	117	asAfsa (Aam) aGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	213
AD-63179	ascsAfuAfuuuGfAfUfcAfguCfUfuuuu	118	asAfsAfaaGfaCfuGfaucAfAfAfuAfugusug	214
AD-63180	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	119	as (Aams) aAfaGfaCfuGfaucAfaAfu (Aam) uGfusug	215
AD-63181	ascsAfuAfuuuGfAfUfcAfguCfUfuuuu	120	asAfsAfAfaGfaCfuGfaucAfAfAfuAfugusug	216
AD-63182	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	121	asAfsa (Aam) aGfaCfuGfaucAfaAfu (Aam) uGfusug	217
AD-63183	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	122	asasaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	218
AD-63185	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	123	asAfsaAfagaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	219
AD-63186	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	124	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	220
AD-63187	AfscsAfuAfuUfuGfAfucAfgUfcUfuUfuUf	125	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	221
AD-63188	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	126	as (Aams) aAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	222
AD-64744	ascsauauuugadTcagucdTuuuu	127	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	223
AD-64745	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	128	asAfsaaaGfacuGfaucAfaauangusug	224
AD-64746	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	129	asdAsaaagacugaucdAadAuaugusug	225
AD-64747	ascsauauuuGfaUfcagUfcuuUfu	130	asAfsaaaGfacuGfaucAfaAfuangusug	226

Название дуплекса	Смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO
AD-64748	ascsauauuugadTcagucdAuuuu	131	asdAsaaagacudGaucdAaauaugusug	227
AD-64749	ascsauauuuGfaUfcagUfcuuUfuU	132	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	228
AD-64750	ascsauauuugadTdCagucdTuuuu	133	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	229
AD-64751	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	134	asdAsaaadGacudGaucdAaauaugusug	230
AD-64752	ascsauauuuGfaUfcagUfcuuuuu	135	asAfsaaaGfacuGfaucAfaAfuaugusug	231
AD-64753	ascsauauuugadTcagucdAuuuu	136	asdAsaaadGacugaucdAaauaugusug	232
AD-64754	ascsauauuuGfaUfcagUfcuuuuu	137	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	233
AD-64755	ascsauauuugadTdCagucdCuuuu	138	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	234
AD-64756	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	139	asAfsaaagacugaucAfaauaugusug	235
AD-64757	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	140	asAsaaagacudGaucdAaauaugusug	236
AD-64758	ascsauauuuGfaUfcagUfcuuUfuU	141	asAfsaaaGfacUfGfaucAfaAfuaugusug	237
AD-64759	ascsauauuugadTcagucdAuuuu	142	asdAsaaadGacudGaucdAaauaugusug	238
AD-64760	ascsauauuuuadTcagucuuuuu	143	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	239
AD-64761	ascsauauuugadTcagucdGuuuu	144	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	240
AD-64762	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	145	asdAsaaagacugaucdAaauaugusug	241
AD-64763	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	146	asdAsaaagacudGaucAaauaugusug	242
AD-64764	ascsauauuuGfaUfcagUfcuuuuu	147	asAfsaaaGfacUfGfaucAfaAfuaugusug	243
AD-64765	ascsauauuugaUcaguc (Tgn) uuuu	148	asdAsaaagacudGaucdAaauaugusug	244
AD-64766	ascsauauuugadTcagu (Cgn) uuuuu	149	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	245
AD-64767	ascsauauuugadTcagucdCuuuu	150	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	246
AD-64768	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	151	asasaaagacudGaucdAaauaugusug	247
AD-64769	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	152	asAsaaagacudGaucAaauaugusug	248
AD-64770	ascsauauuugadTcaguc (Tgn) uuuu	153	asdAsaaagacudGaucdAaauaugusug	249
AD-64771	ascsauauuugaUcaguc (Tgn) uuuu	154	asdAsaaadGacugaucdAaauaugusug	250
AD-64772	ascsauauuugadTcagucdAuuuu	155	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	251
AD-64773	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	156	asasaaadGacugaucdAaauaugusug	252
AD-64774	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	157	asAsaaadGacugaucAaauaugusug	253
AD-64775	ascsauauuugadTcaguc (Tgn) uuuu	158	asdAsaaadGacugaucdAaauaugusug	254
AD-64776	ascsauauuugaUcaguc (Tgn) uuuu	159	asdAsaaadGacudGaucdAaauaugusug	255

Название дуплекса	Смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO
AD-64777	ascsauauuugadTcagucu (Tgn) uuu	160	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	256
AD-64778	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	161	asAfsaaaGfacuGfaucAfaAfuaugusug	257
AD-64779	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	162	asdAsaaagacudGaucdAaauaugusug	258
AD-64780	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	163	PasdAsaaagacudGaucdAaauaugusug	259
AD-64781	ascsauauuugadTcaguc (Tgn) uuuu	164	asdAsaadGacudGaucdAaauaugusug	260
AD-64782	ascsauauuugaUcaguc (Tgn) uuuu	165	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	261
AD-64783	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	166	asAfsaaaGfacUfGfaucAfaAfuaugusug	262
AD-64784	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	167	asdAsaadGacugaucdAaauaugusug	263
AD-64785	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	168	PasasaaagacudGaucdAaauaugusug	264
AD-64786	ascsauauuugadTcaguc (Tgn) uuuu	169	PasdAsaaagacudGaucdAaauaugusug	265

Таблица 3 Скрининг ANGPTL3 с однократной дозой в клетках НерЗВ

Данные выражены в виде процентного количества оставшейся матричной РНК в сравнении с контрольным AD-1955, не осуществляющим целенаправленное воздействие.

Название дуплекса	10 нМ, AVG	0,1 нМ, AVG	10 нМ, STDEV	0,1 нМ, STDEV
AD-57927	3,9	4,3	1,9	1,0
AD-63131	14,3	15,6	7,7	6,0
AD-63132	12,5	10,6	2,3	3,0
AD-63133	8,6	7,5	1,4	1,9
AD-63134	17,3	15,9	2,8	1,9
AD-63136	2,7	4,3	0,9	1,4
AD-63137	2,9	3,4	0,9	0,7
AD-63138	13,6	18,8	3,9	3,9
AD-63139	7,5	9,0	2,6	1,7
AD-63140	13,0	15,0	8,6	6,7
AD-63142	3,2	3,9	0,7	0,4
AD-63143	5,3	4,6	2,3	2,2
AD-63144	5,6	6,6	2,9	3,0
AD-63145	7,3	6,6	1,8	0,9
AD-63146	17,5	14,5	2,5	4,6
AD-63148	2,9	3,1	1,4	2,2
AD-63149	6,3	7,2	2,1	1,4
AD-63150	4,8	6,5	1,9	2,5
AD-63151	4,7	4,7	2,3	2,9
AD-63152	10,3	12,2	2,0	1,5
AD-63153	5,1	4,9	1,9	2,4
AD-63154	9,4	7,9	3,7	3,0
AD-63155	13,4	13,2	5,1	4,3
AD-63156	3,3	4,4	1,1	1,4
AD-63157	2,6	4,4	2,1	1,8
AD-63158	16,7	23,9	8,7	7,2
AD-63160	3,5	3,7	1,9	1,2
AD-63161	11,7	12,6	5,7	1,2
AD-63162	3,9	6,2	1,2	1,5
AD-63163	3,7	3,6	2,5	1,7
AD-63164	11,3	13,6	8,2	5,0
AD-63165	12,5	13,3	3,7	5,2
AD-63166	8,8	13,6	5,2	9,4
AD-63167	3,3	2,8	1,2	0,9
AD-63168	7,3	9,0	6,0	5,0
AD-63169	10,8	12,1	8,7	7,2
AD-63170	3,7	3,8	1,1	0,9

Название дуплекса	10 нМ, AVG	0,1 нМ, AVG	10 нМ, STDEV	0,1 нМ, STDEV
AD-63171	12,5	16,4	6,9	2,6
AD-63172	8,7	10,1	7,2	4,7
AD-63173	3,0	3,6	1,3	2,5
AD-63174	2,8	3,7	1,5	1,6
AD-63175	5,2	3,4	2,8	2,6
AD-63176	3,3	4,2	0,9	0,4
AD-63177	5,3	7,3	2,3	0,6
AD-63179	3,0	4,0	0,9	0,9
AD-63180	66,8	92,2	22,2	13,5
AD-63181	4,8	5,4	1,9	1,0
AD-63182	14,7	23,1	4,7	6,4
AD-63183	11,8	14,3	5,5	4,7
AD-63185	7,9	8,8	0,7	2,8
AD-63186	57,6	72,0	12,1	15,7
AD-63187	9,8	14,1	4,8	2,8
AD-63188	30,9	49,8	20,7	8,3
AD-64744	16,6	57,4	1,4	9,8
AD-64745	12,0	58,3	2,2	17,5
AD-64746	67,3	99,4	6,1	14,5
AD-64747	18,0	65,1	2,5	2,2
AD-64748	69,0	87,2	5,2	5,6
AD-64749	16,4	70,5	5,0	11,2
AD-64750	12,3	44,3	4,6	7,0
AD-64751	57,9	87,5	7,5	7,4
AD-64752	18,7	54,1	4,0	16,1
AD-64753	57,6	81,9	5,1	4,4
AD-64754	21,2	72,3	2,4	6,7
AD-64755	9,0	32,7	2,3	9,1
AD-64756	17,2	53,7	3,9	7,9
AD-64757	89,0	92,0	4,4	5,8
AD-64758	23,5	66,1	10,9	4,9
AD-64759	61,6	80,3	6,9	5,7
AD-64760	8,7	50,0	3,6	5,7
AD-64761	12,7	36,7	5,7	6,4
AD-64762	107,7	98,0	9,1	10,9
AD-64763	72,8	84,8	6,0	9,7
AD-64764	21,7	57,5	7,8	6,3
AD-64765	67,9	80,2	7,5	3,0
AD-64766	11,3	38,8	5,4	11,3
AD-64767	13,2	39,0	5,8	9,5
AD-64768	74,3	102,3	6,5	9,2
AD-64769	57,1	86,9	5,4	1,1
AD-64770	68,5	78,2	3,2	9,0

Название дуплекса	10 нМ, AVG	0,1 нМ, AVG	10 нМ, STDEV	0,1 нМ, STDEV
AD-64771	45,4	68,5	2,0	8,3
AD-64772	11,8	50,0	2,7	1,7
AD-64773	53,8	98,1	1,3	8,6
AD-64774	43,2	82,4	7,2	8,1
AD-64775	42,9	78,7	1,4	13,8
AD-64776	52,6	70,1	2,9	4,3
AD-64777	19,8	65,8	3,7	6,8
AD-64778	7,9	34,7	2,2	9,6
AD-64779	66,9	86,3	7,3	7,9
AD-64780	78,8	89,0	7,8	5,1
AD-64781	54,6	82,1	12,9	11,2
AD-64782	9,2	56,1	5,0	18,3
AD-64783	8,0	35,7	1,4	8,5
AD-64784	52,6	80,3	4,4	6,1
AD-64785	92,4	93,9	9,8	4,3
AD-64786	83,4	85,4	8,4	7,5

Таблица 4А. Дополнительные модифицированные средства для RNAi ANGPTL3

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Модифицированная антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO
AD-62865	UfsgsUfcAfcUfuGfAfAfcUfcAfaCfuCfaAfL96	266	usUfsgAfgUfuGfaGfuucAfaGfuGfaCfasusa	278
AD-66916	asascuaaCfuAfAfCfuuaauucaaL96	267	usUfsugaAfuUfAfaguuAfgUfuaguusgsc	279
AD-66917	uscsacaaUfuAfAfGfcuccuucuuuL96	268	asAfsagaAfgGfAfgcuuAfaUfugugasasc	280
AD-66918	gsasgcaaCfuAfAfCfuaacuuaauuL96	269	asAfsuaaAfgUfUfaguuaGfuUfgcucsusu	281
AD-66919	ususauugUfuCfCfUfcuaguuaauuL96	270	asAfsauaAfcUfAfgaggAfaCfaauaasasa	282
AD-66920	asusuaagCfuCfCfUfucuuuuuauuL96	271	asAfsuaaAfaAfGfaaggAfgCfuuaaususg	283
AD-66921	usgsucacUfuGfAfAfcucaacucaaL96	272	usUfsgagUfuGfAfguucAfaGfugacasusa	284
AD-66922	gsasauauGfuCfAfCfuugaacucaaL96	273	usUfsgagUfuCfAfagugAfcAfuauucsusu	285
AD-66923	ascsauauUfuGfAfUfcagucuuuuuL96	274	asAfsaaaGfaCfUfgaucAfaAfuaugusug	286
AD-66924	csasacauAfuUfUfGfaucagucuuuL96	275	asAfsagaCfuGfAfucaaAfuAfuguugsasg	287
AD-66925	csusccauAfgUfGfAfagcaaucuaaL96	276	usUfsagaUfuGfCfuucaCfuAfuggagsusa	288
AD-65695	ascsauauUfuGfAfUfcagucuuuuuL96	277	asAfsaaaGfacugaucAfaAfuaugusug	289

Таблица 4В. Дополнительные модифицированные средства для RNAi ANGPTL3

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Модифицированная антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO
AD-62865	UfsgsUfcAfcUfuGfAfAfcUfcAfaCfuCfaAf	266	usUfsgAfgUfuGfaGfuucAfaGfuGfaCfasusa	278
AD-66916	asascuaaCfuAfAfCfuuaauucaaa	267	usUfsugaAfuUfAfaguuAfgUfuaguusgsc	279
AD-66917	uscsacaaUfuAfAfGfcuccuucuuu	268	asAfsagaAfgGfAfgcuuAfaUfugugasasc	280
AD-66918	gsasgcaaCfuAfAfCfuaacuuaauu	269	asAfsuuaAfgUfUfaguuaGfuUfgcucsusu	281
AD-66919	ususauugUfuCfCfUfcuaguuaauu	270	asAfsauaAfcUfAfgaggAfaCfaauaasasa	282
AD-66920	asusuaagCfuCfCfUfucuuuuuauu	271	asAfsuaaAfaAfGfaaggAfgCfuuaaususg	283
AD-66921	usgsucacUfuGfAfAfcucaacucaa	272	usUfsgagUfuGfAfguucAfaGfugacasusa	284
AD-66922	gsasauauGfuCfAfCfuugaacucaa	273	usUfsgagUfuCfAfagugAfcAfuauucsusu	285
AD-66923	ascsauauUfuGfAfUfcagucuuuuu	274	asAfsaaaGfaCfUfgaucAfaAfuaugusug	286
AD-66924	csasacauAfuUfUfGfaucagucuuu	275	asAfsagaCfuGfAfucaaAfuAfuguugsasg	287
AD-66925	csusccauAfgUfGfAfagcaaucuaa	276	usUfsagaUfuGfCfuucaCfuAfuggagsusa	288
AD-65695	ascsauauUfuGfAfUfcagucuuuuu	277	asAfsaaaGfacugaucAfaAfuaugusug	289

Таблица 5 Дополнительные немодифицированные средства для RNAi ANGPTL3

Название дуплекса	Немодифицированная смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Немодифицированная антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	5'-концевое положение для антисмысловой нити в NM_014495.3
AD-62865	UGUCACUUGAACUCAACUCAA	290	UUGAGUUGAGUUCAAGUGACAUA	302	425
AD-66916	AACUAACUAACUUAUUCAAA	291	UUUGAAUUAAGUUAGUUAGUUGC	303	509
AD-66917	UCACAAUUAAGCUCCUUCUUU	292	AAAGAAGGAGCUUAAUUGUGAAC	304	83
AD-66918	GAGCAACUAACUAACUUAUU	293	AAUUAAGUUAGUUAGUUGCUCUU	305	505
AD-66919	UUAUUGUCCUCUAGUUUUU	294	AAAUAACUAGAGGAACAAUAAAA	306	104
AD-66920	AUUAAGCUCCUUCUUUUUUUU	295	AAUAAAAAGAAGGAGCUUAAUUG	307	88
AD-66921	UGUCACUUGAACUCAACUCAA	296	UUGAGUUGAGUUCAAGUGACAUA	308	424
AD-66922	GAAUAUGUCACUUGAACUCAA	297	UUGAGUUCAAGUGACAUAUUCUU	309	420
AD-66923	ACAUAUUUGAUCAGUCUUUUU	298	AAAAAGACUGAUCAAUAUGUUG	310	305
AD-66924	CAACAUAUUUGAUCAGUCUUU	299	AAAGACUGAUCAAUAUGUUGAG	311	303
AD-66925	CUCCAUAUGAGAAGCAAUCUAA	300	UUAGAUUGCUUCACUAUGGAGUA	312	1041
AD-65695	ACAUAUUUGAUCAGUCUUUUU	301	AAAAAGACUGAUCAAUAUGUUG	313	305

Пример 4. Сайленсинг ANGPTL3 *in vivo* у мышей дикого типа

Эффективность и продолжительность действия *in vivo* поднабора дополнительных средств, описанных выше, оценивали у мышей дикого типа (C57BL/6). Самкам мышей в возрасте шести-восьми недель подкожно вводили одну дозу 3 мг/кг средств, и в сыворотке крови животных определяли уровень ANGPTL3 мыши до приема дозы, в день 0 и в дни 4, 10, 17, 27, 38 и 52 после приема дозы. Для этих анализов использовали трех мышей на группу. Уровни ANGPTL3 анализировали с использованием анализа ELISA и набора Quantikine для ELISA ангиопоэтин-подобного белка 3 мыши от R&D Systems (номер по каталогу MANL30).

Результаты этих анализов представлены на фигурах 6А и 6В. Как продемонстрировано на фигуре 6А, все средства осуществляли действенное и продолжительное ингибирование экспрессии ANGPTL3 и обеспечивали достижение самого низкого его уровня в приблизительно день 4 после введения. Как продемонстрировано на фигуре 6В, в день 10 после приема дозы уровень ANGPTL3 был наиболее низким у животных, которым вводили AD-63174 и AD-63175, по сравнению с другими анализируемыми средствами.

Второй поднабор дополнительных средств, описанных выше, также оценивали у мышей дикого типа (C57BL/6). Самкам мышей в возрасте шести-восьми недель подкожно вводили одну дозу 1 мг/кг либо одну дозу 3 мг/кг средств, и в сыворотке крови животных определяли уровень ANGPTL3 мыши до приема дозы, в день 0 и в дни 5, 14, 21, 28 и 42 после приема дозы. (Для групп животных, которым вводили AD-65695, в связи с увеличенной продолжительностью ответа на данное средство по сравнению с ответом на другие тестируемые средства также определяли уровень ANGPTL3 мыши в сыворотке крови животных, которым вводили AD-65695, в день 55 после приема дозы). Для этих анализов использовали трех мышей на группу. Уровни ANGPTL3 анализировали с использованием анализа ELISA, как описано выше.

Результаты этих анализов представлены на фигурах 7А и 7В и демонстрируют, что все средства осуществляли действенное и продолжительное ингибирование экспрессии ANGPTL3 и обеспечивали достижение самого низкого его уровня в приблизительно день 5

после введения (фигура 7A), и что животные, которым вводили AD-65695, имели наиболее низкие уровни ANGPTL3 при дозе 1 мг/кг и 3 мг/кг по сравнению с другими анализируемыми средствами (фигура 7B).

Пример 5. Сайленсинг ANGPTL3 *in vivo* у мышей *ob/ob*

Эффективность и продолжительность действия *in vivo* поднабора дополнительных средств, описанных выше, оценивали у мышей *ob/ob*. Самкам мышей *ob/ob* в возрасте шести-восьми недель подкожно вводили одну дозу 3 мг/кг средств, и в сыворотке крови животных определяли уровень ANGPTL3 мыши до приема дозы, в день 0 и в дни 5, 13, 24 и 38 после приема дозы. Для этих анализов использовали четырех мышей на группу. Уровни ANGPTL3 анализировали с использованием анализа ELISA, как описано выше.

Результаты этих анализов представлены на фигурах 8A и 8B и демонстрируют, что все средства осуществляли действенное и продолжительное ингибирование экспрессии ANGPTL3 и обеспечивали достижение самого низкого его уровня в приблизительно день 5 после введения (фигура 8A), и что животные, которым вводили AD-63175 или AD-65695, характеризовались наиболее высоким сайленсингом уровней ANGPTL3 при дозе 3 мг/кг по сравнению с другими анализируемыми средствами (фигура 8B).

Дозозависимый эффект AD-65695 анализировали у мышей *ob/ob* путем подкожного введения животным однократной дозы 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг или 9 мг/кг, и уровень ANGPTL3 мыши определяли в сыворотке крови животных до приема дозы и в дни 5 и 13 после приема дозы. Уровни ANGPTL3 анализировали с использованием анализа ELISA, как описано выше, и также измеряли уровни сывороточных триглицеридов (TG), холестерина липопротеинов низкой плотности (LDLc), холестерина липопротеинов высокой плотности (HDLc) и общего холестерина (TC) с помощью анализатора Olympus.

На фигуре 9 продемонстрировано, что в день 5 наблюдался 58% сайленсинг белка ANGPTL3 в сыворотке крови животных, которым вводили дозу 0,3 мг/кг AD-65695, 82% сайленсинг белка ANGPTL3 в сыворотке крови животных, которым вводили дозу 1 мг/кг AD-65695, 98% сайленсинг белка ANGPTL3 в сыворотке крови животных, которым

вводили дозу 3 мг/кг AD-65695, и 99% сайленсинг белка ANGPTL3 в сыворотке крови животных, которым вводили дозу 9 мг/кг AD-65695.

На фигуре 10A показаны уровни TG у мышей *ob/ob* после введения контрольного PBS или AD-65695; на фигуре 10B показаны уровни TC, измеренные у мышей *ob/ob* после введения контрольного PBS или AD-65695; на фигуре 10C показаны уровни LDLc у мышей *ob/ob* после введения контрольного PBS или AD-65695; и на фигуре 10D показано соотношение HDLc и TC у мышей *ob/ob* после введения контрольного PBS или AD-65695. Данные демонстрируют, что введение AD-65695 приводит к снижению уровней TG, LDLc и TC у мышей *ob/ob* по сравнению с контрольными экспериментами при всех анализируемых дозах (80% снижение уровней сывороточных LDLc и TG наблюдалось при использовании одной дозы 3 мг/кг AD-65695).

Пример 6. Сайленсинг ANGPTL3 *in vivo* у мышей, инфицированных AAV-TBG-ANGPTL3

Для определения продолжительности снижения уровней белка ANGPTL3 человека под действием однократной дозы поднабора дополнительных средств, описанных выше, в день -14 до приема дозы мышей дикого типа (C57BL/6) инфицировали путем внутривенного введения 1×10^{11} вирусных частиц вектора на основе аденоассоциированного вируса 8 типа (AAV8), кодирующего ген ANGPTL3 человека (кодирующий участок), управляемый печеночноспецифическим промотором гена тироксинсвязывающего глобулина (TBG) (AAV8-TBG-ANGPTL3), в 200 мкл. В день 0 мышам подкожно вводили одну дозу 3 мг/кг средств, и в сыворотке крови животных определяли уровень ANGPTL3 до приема дозы и в дни 5, 14, 28 и 42 после приема дозы (см. фигуру 11). Уровень ANGPTL3 мыши в образцах сыворотки крови определяли с помощью анализа ELISA, описанного выше, и уровень ANGPTL3 человека в образцах сыворотки крови определяли с помощью анализа ELISA, в котором используется антитело, выявляющее ANGPTL3 человека и макака-крабоеда, но не реагирующее перекрестно с ANGPTL3 мыши (набор Quantikine для ELISA ангиопоэтин-подобного белка 3 человека от R&D Systems). Сыворотка крови "наивных" мышей (мышей, не подвергавшихся воздействию AAV) служила в качестве

отрицательного контроля в этих анализах. Два из вводимых средств, AD-57927 и AD-65695, перекрестно реагировали с мРНК ANGPTL3 мыши, крысы, макака-крабоеда и человека (m/r/cy/h). Другие два вводимых средства, AD-62865 и AD-62866, перекрестно реагировали только с мРНК ANGPTL3 макака-крабоеда и человека (cy/h).

Уровни белка ANGPTL3 человека после введения средств или контрольного PBS показаны на фигуре 12A, и уровни ANGPTL3 мыши после введения средств или контрольного PBS показаны на фигуре 12B, и, как и ожидалось, сайленсинг ANGPTL3 мыши после введения средств для cy/h AD-62865 и AD-62866 не наблюдался. Результаты демонстрируют, что после введения средств достигался нокдаун ANGPTL3 человека величиной до 80%, при этом в течение по меньшей мере 4 недель поддерживался ~ 60% нокдаун ANGPTL3. Данные также демонстрируют, что после введения перекрестно реагирующего средства для m/r/cy/h AD-65695 наблюдался > 90% нокдаун ANGPTL3 мыши, при этом в течение по меньшей мере 4 недель после введения одной дозы 3 мг/кг AD-65695 поддерживался ~ 75% нокдаун ANGPTL3. Кроме того, данные демонстрируют, что после введения средства для m/r/cy/h AD-65695 и средства для cy/h AD-62865 имела место сравнимая эффективность и продолжительность нокдауна ANGPTL3.

Анализ продолжительности функционирования с однократной дозой также осуществляли с AD-65695, AD-62865 и AD-62866. Как показано на фигуре 13, мышам, инфицированным AAV8-TBG-ANGPTL3, вводили одну дозу 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг AD-65695, или мышам, инфицированным AAV8-TBG-ANGPTL3, вводили одну дозу 1 мг/кг или 3 мг/кг AD-62865, или мышам, инфицированным AAV8-TBG-ANGPTL3, вводили одну дозу 0,3 мг/кг AD-62866. Сыворотку крови собирали у животных до приема дозы и в дни 11, 25 и 39 после приема дозы, и уровень ANGPTL3 мыши и человека определяли с помощью анализов ELISA, как описано выше.

Данные из этих анализов представлены на фигурах 14A, 14B, 15A и 15B. На фигурах 14A и 14B представлены уровни ANGPTL3 человека и мыши соответственно после введения средств в день 11 после приема дозы. На фигурах 15A и 15B представлены уровни ANGPTL3 человека и мыши соответственно до приема дозы и после

введения одной дозы 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг AD-65695 в дни 11, 25 и 39. Данные демонстрируют, что AD-65695 (средство для m/r/cy/h) характеризуется эффективной дозой у 80% животных (ED_{80}), составляющей 3 мг/кг, и ED_{40} , составляющей 1 мг/кг, для ANGPTL3 человека. Данные также демонстрируют, что AD-65695 характеризуется ED_{90} , составляющей 3 мг/кг, ED_{70} , составляющей 1 мг/кг, и ED_{50} , составляющей 0,3 мг/кг, для ANGPTL3 мыши. В дополнение, данные демонстрируют, что AD-62865 (средство для cy/h) характеризуется ED_{80} , составляющей 3 мг/кг, для ANGPTL3 человека.

Эффективность дополнительных средств, имеющих меньшее количество 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов по сравнению с исходной последовательностью, из которой они были получены (описанных в таблицах 4A и 4B выше), анализировали у мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3, посредством введения одной дозы 1 мг/кг средств. Сыворотку крови собирали у животных до приема дозы и в день 9 после приема дозы, и уровень ANGPTL3 мыши и человека определяли с помощью анализов ELISA, как описано выше. Результаты этих анализов представлены в таблице 6 ниже и на фигуре 16, где продемонстрировано, что три из средств, имеющих меньшее количество 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов по сравнению с исходной последовательностью, AD-66920, AD-66921 и AD-66922, характеризовались улучшенной продолжительностью нокдауна ANGPTL3 человека по сравнению с cy/h-специфическим средством AD-62865.

Таблица 6 Сайленсинг ANGPTL3 *in vivo* у мышей, инфицированных AAV-TBG-ANGPTL3

				День 9, по сравнению с уровнем до приема дозы					
Группа	n#	Название дуплекса	Доза (мг/кг)	ANGPTL3 человека		ANGPTL3 мыши		Перекрестная реактивность для мыши	5'-концевое положение-мишень для антисмысловой нити в NM_014495.3
				Среднее	SD	Среднее	SD		
1	2	PBS		0,8	0,3	1,4	0,08		
2	3	AD-62865	1	0,44	0,14	1,0	0,16		
3	3	AD-66916	1	0,44	0,11	1,3	0,25		482
4	3	AD-66917	1	0,58	0,22	1,2	0,17		56

5	3	AD-66918	1	1,39	0,68	0,9	0,42		478
6	3	AD-66919	1	0,88	0,25	1,1	0,16		77
7	3	AD-66920	1	0,41	0,05	1,0	0,14		61
8	3	AD-66921	1	0,39	0,14	1,1	0,40		398
9	3	AD-66922	1	0,27	0,08	1,2	0,38		393
10	3	AD-66923	1	0,67	0,21	0,3	0,07	да	278
11	3	AD-66924	1	0,62	0,20	0,5	0,07	да	276
12	3	AD-66925	1	0,70	0,22	0,9	0,11		1014
	3	AD-65695	1	0,60	0,14	0,3	0,08	да	278

Таблица 7А. Дополнительные модифицированные средства для RNAi ANGPTL3

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Модифицированная антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO
AD-67021	gsasauadTgudGacuugaa (Cgn) ucaaL96	314	usdTsgaguucaagdTgdAcauauucsusu	335
AD-67022	gsasauadTgudGacuugaa (Cgn) ucaaL96	315	us (Ufms) gaguucaagdTgdAcauauucsusu	336
AD-67173	gsasauauGfuCfAfCfuugaacucuaaL96	316	usdTsgaguucaagdTgdAcauauucsusu	337
AD-67174	gsasauadTgudGacuugaa (Cgn) ucaaL96	317	usUfsgagUfuCfAfagugAfcAfuaauucsusu	338
AD-66922	gsasauauGfuCfAfCfuugaacucuaaL96	318	usUfsgagUfuCfAfagugAfcAfuaauucsusu	339
AD-67008	asusuaadGcudGcuucuuu (Tgn) uauuL96	319	asdAsuaaaaagaadGgdAgcuuaaususg	340
AD-67007	asusuaadGcudGcuucuuu (Tgn) uauuL96	320	asAfsuaaAfaagaaggAfgCfuuaaususg	341
AD-67006	asusuaagCfuCfCfUfucuuuuuauuL96	321	asdAsuaaaaagaadGgdAgcuuaaususg	342
AD-66920	asusuaagCfuCfCfUfucuuuuuauuL96	322	asAfsuaaAfaAfGfaaggAfgCfuuaaususg	343
AD-67028	ascsauadTuudCaucaguc (Tgn) uuuuL96	323	asdAsaaagacugadTcdAaaauaugusug	344
AD-67013	usgsucadCuudCaacucuaa (Cgn) ucaaL96	324	usdTsgaguugagudTcdAagugacasusa	345
AD-67014	usgsucadCuudCaacucuaa (Cgn) ucaaL96	325	us (Ufms) gaguugagudTcdAagugacasusa	346
AD-66921	usgsucacUfuGfAfAfcucaacucuaaL96	326	usUfsgagUfuGfAfguucAfaGfugacasusa	347
AD-66974	asascuaacuuaauu (Tgn) caaaL96	327	usdTsgaauuaagdTudAguuaguusgsc	348
AD-66973	asascudAacuuacuuaau (Tgn) caaaL96	328	usdTsgaauuaagdTudAguuaguusgsc	349
AD-66916	asascuaaCfuAfAfCfuuaaucaaaaL96	329	usUfsugaAfuUfAfaguuAfgUfuaguusgsc	350
AD-66925	csusccauAfgUfGfAfagcaaucuaaL96	330	usUfsagaUfuGfCfuucaCfuAfuggagsusa	351
AD-67042	csusccadTagdAgaagcaa (Tgn) cuaaL96	331	usdTsgauugcuudCadCuauggagsusa	352
AD-66923	ascsauauUfuGfAfUfcagucuuuuuL96	332	asAfsaaaGfaCfUfgaucAfaAfuaugusug	353
AD-67026	ascsauauUfuGfAfUfcagucuuuuuL96	333	asdAsaaagacugadTcdAaaauaugusug	354
AD-67027	ascsauadTuudCaucaguc (Tgn) uuuuL96	334	asAfsaaaGfacugaucAfaAfuaugusug	355

Таблица 7В. Дополнительные модифицированные средства для RNAi ANGPTL3

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Модифицированная антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO
AD-67021	gsasauadTgudGacuugaa (Cgn) ucaa	314	usdTsgaguucaagdTgdAcauauucsusu	335
AD-67022	gsasauadTgudGacuugaa (Cgn) ucaa	315	us (Ufms) gaguucaagdTgdAcauauucsusu	336
AD-67173	gsasauauGfuCfAfCfuugaacucuaa	316	usdTsgaguucaagdTgdAcauauucsusu	337
AD-67174	gsasauadTgudGacuugaa (Cgn) ucaa	317	usUfsgagUfuCfAfagugAfcAfuaauucsusu	338
AD-66922	gsasauauGfuCfAfCfuugaacucuaa	318	usUfsgagUfuCfAfagugAfcAfuaauucsusu	339
AD-67008	asusuaadGcudGcuucuuu (Tgn) uauu	319	asdAsuaaaaagaadGgdAgcuuaaususg	340
AD-67007	asusuaadGcudGcuucuuu (Tgn) uauu	320	asAfsuaaAfaagaaggAfgCfuuaaususg	341
AD-67006	asusuaagCfuCfCfUfucuuuuuauu	321	asdAsuaaaaagaadGgdAgcuuaaususg	342
AD-66920	asusuaagCfuCfCfUfucuuuuuauu	322	asAfsuaaAfaAfGfaaggAfgCfuuaaususg	343
AD-67028	ascsauadTuudCaucaguc (Tgn) uuuu	323	asdAsaaagacugadTcdAaauaugusug	344
AD-67013	usgsucadCuudCaacucuaa (Cgn) ucaa	324	usdTsgaguugagudTcdAagugacasusa	345
AD-67014	usgsucadCuudCaacucuaa (Cgn) ucaa	325	us (Ufms) gaguugagudTcdAagugacasusa	346
AD-66921	usgsucacUfuGfAfAfcucaacucuaa	326	usUfsgagUfuGfAfguucAfaGfugacasusa	347
AD-66974	asascuaacuacuuuuu (Tgn) caaa	327	usdTsgaauuaagdTudAguuaguusgsc	348
AD-66973	asascudAacuuacuuaau (Tgn) caaa	328	usdTsgaauuaagdTudAguuaguusgsc	349
AD-66916	asascuaaCfuAfAfCfuuaauuuaaa	329	usUfsugaAfuUfAfaguuAfgUfuaguusgsc	350
AD-66925	csusccauAfgUfGfAfagcaaucuaa	330	usUfsagaUfuGfCfuucaCfuAfuggagsusa	351
AD-67042	csusccadTagdAgaagcaa (Tgn) cuaa	331	usdTsgauugcuudCadCuauggagsusa	352
AD-66923	ascsauauUfuGfAfUfcagucuuuuu	332	asAfsaaaGfaCfUfgaucAfaAfuaugusug	353
AD-67026	ascsauauUfuGfAfUfcagucuuuuu	333	asdAsaaagacugadTcdAaauaugusug	354
AD-67027	ascsauadTuudCaucaguc (Tgn) uuuu	334	asAfsaaaGfacugaucAfaAfuaugusug	355

Таблица 7С. Дополнительные немодифицированные средства для RNAi ANGPTL3

Название дуплекса	Немодифицированная смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Немодифицированная антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO
AD-67021	GAAUATGUGACUUGAACUCAA	356	UTGAGUUCAAGTGACAUAUUCUU	377
AD-67022	GAAUATGUGACUUGAACUCAA	357	UUGAGUUCAAGTGACAUAUUCUU	378
AD-67173	GAAUAUGUCACUUGAACUCAA	358	UTGAGUUCAAGTGACAUAUUCUU	379
AD-67174	GAAUATGUGACUUGAACUCAA	359	UUGAGUUCAAGUGACAUAUUCUU	380
AD-66922	GAAUAUGUCACUUGAACUCAA	360	UUGAGUUCAAGUGACAUAUUCUU	381
AD-67008	AUUAAGCUGCUUCUUUTUAUU	361	AAUAAAAAGAAGGAGCUUAAUUG	382
AD-67007	AUUAAGCUGCUUCUUUTUAUU	362	AAUAAAAAGAAGGAGCUUAAUUG	383
AD-67006	AUUAAGCUCCUUCUUUUUAUU	363	AAUAAAAAGAAGGAGCUUAAUUG	384
AD-66920	AUUAAGCUCCUUCUUUUUAUU	364	AAUAAAAAGAAGGAGCUUAAUUG	385
AD-67028	ACAUATUUCAUCAGUCTUUUU	365	AAAAAGACUGATCAAAUAUGUUG	386
AD-67013	UGUCACUUCAACUCAACUCAA	366	UTGAGUUGAGUTCAAGUGACAU	387
AD-67014	UGUCACUUCAACUCAACUCAA	367	UUGAGUUGAGUTCAAGUGACAU	388
AD-66921	UGUCACUUGAACUCAACUCAA	368	UUGAGUUGAGUUCAAGUGACAU	389
AD-66974	AACUAACUUACUUAUTCAAA	369	UTUGAAUUAAGTUAGUUAGUUGC	390
AD-66973	AACUAACUUACUUAUTCAAA	370	UTUGAAUUAAGTUAGUUAGUUGC	391
AD-66916	AACUAACUAACUUAUUCAAA	371	UUUGAAUUAAGUUAGUUAGUUGC	392
AD-66925	CUCCAUAGUGAAGCAAUCUAA	372	UUAGAUUGCUUCACUAUGGAGUA	393
AD-67042	CUCCATAGAGAAGCAATCUAA	373	UTAGAUUGCUUCACUAUGGAGUA	394
AD-66923	ACAUUUUUGAUCAGUCUUUUU	374	AAAAAGACUGAUCAAAUAUGUUG	395
AD-67026	ACAUUUUUGAUCAGUCUUUUU	375	AAAAAGACUGATCAAAUAUGUUG	396
AD-67027	ACAUATUUCAUCAGUCTUUUU	376	AAAAAGACUGAUCAAAUAUGUUG	397

Пример 7. Сайленсинг ANGPTL3 *in vivo* у мышей, инфицированных AAV-TBG-ANGPTL3

Второй поднабор дополнительных средств, перечисленных в таблицах 7А, 7В и 7С, анализировали у мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3. Модифицированные нуклеотидные последовательности смысловой и антисмысловой нитей с этими последовательностями представлены в таблицах 8А и 8В. Вкратце, и как описано выше, в день -14 до приема дозы мышей дикого типа (C57BL/6) инфицировали путем внутривенного введения 1×10^{11} вирусных частиц. В день 0 мышам вводили одну дозу 1 мг/кг или 3 мг/кг средств. Сыворотку крови собирали у животных до приема дозы и в дни 14 и 28 после приема дозы, и уровень ANGPTL3 мыши и человека определяли с помощью анализов ELISA, как описано выше.

Результаты этих анализов представлены в таблице 9 ниже и на фигурах 17А и 17В. Результаты демонстрируют, что средства AD-67173, AD-67174, AD-66922, AD-67007 и AD-66920 характеризовались улучшенной продолжительностью нокдауна ANGPTL3 человека.

Таблица 8А

ID дуплекса	Смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO
AD-67021	gsasauadTgudGacuugaa (Cgn) ucaaL96	398	usdTsgaguucaagdTgdAcauauucsusu	408
AD-67022	gsasauadTgudGacuugaa (Cgn) ucaaL96	399	us (Ufms) gaguucaagdTgdAcauauucsusu	409
AD-67173	gsasauauGfuCfAfCfuugaacucaalL96	400	usdTsgaguucaagdTgdAcauauucsusu	410
AD-67174	gsasauadTgudGacuugaa (Cgn) ucaaL96	401	usUfsgagUfuCfAfagugAfcAfuauucsusu	411
AD-66922	gsasauauGfuCfAfCfuugaacucaalL96	402	usUfsgagUfuCfAfagugAfcAfuauucsusu	412
AD-67008	asusuaadGcudGcuucuuu (Tgn) uauuL96	403	asdAsuaaaaaagaadGgdAgcuuaaususg	413
AD-67007	asusuaadGcudGcuucuuu (Tgn) uauuL96	404	asAfsuaaAfaagaaggAfgCfuuaaususg	414
AD-67006	asusuaagCfuCfCfUfucuuuuuauuL96	405	asdAsuaaaaaagaadGgdAgcuuaaususg	415
AD-66920	asusuaagCfuCfCfUfucuuuuuauuL96	406	asAfsuaaAfaAfGfaaggAfgCfuuaaususg	416
AD-67028	ascsauadTuudCaucaguc (Tgn) uuuuL96	407	asdAsaaagacugadTcdAaauaugususu	417

Таблица 8В

ID дуплекса	Смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO
AD-67021	gsasauadTgudGacuugaa (Cgn) ucaa	398	usdTsgaguucaagdTgdAcauauucsusu	408
AD-67022	gsasauadTgudGacuugaa (Cgn) ucaa	399	us (Ufms) gaguucaagdTgdAcauauucsusu	409

AD-67173	gsasauauGfuCfAfCfuugaacuca a	400	usdTsgaguucaagdTgdAcatauucsu su	410
AD-67174	gsasauadTgudGacuugaa (Cgn) u caa	401	usUfsgagUfuCfAfagugAfcAfuauu csusu	411
AD-66922	gsasauauGfuCfAfCfuugaacuca a	402	usUfsgagUfuCfAfagugAfcAfuauu csusu	412
AD-67008	asusuaadGcudGcuucuuu (Tgn) u auu	403	asdAsuaaaaaagaadGgdAgcuuaausu sg	413
AD-67007	asusuaadGcudGcuucuuu (Tgn) u auu	404	asAfsuaaaAfaagaaggAfgCfuuaaus usg	414
AD-67006	asusuaagCfuCfCfUfucuuuuuau u	405	asdAsuaaaaaagaadGgdAgcuuaausu sg	415
AD-66920	asusuaagCfuCfCfUfucuuuuuau u	406	asAfsuaaaAfaAfGfaaggAfgCfuuaa ususg	416
AD-67028	ascsauadTuudCaucaguc (Tgn) u uuu	407	asdAsaaagacugadTcdAaauaugusu sg	417

Таблица 9

		День 14, по сравнению с уровнем до приема дозы ANGPTL3 человека	
Дуплекс	Доза (мг/кг)	Среднее	SD
PBS	0	0,74	0,27
AD-67021	3	0,48	0,22
AD-67022	3	0,52	0,17
AD-67173	3	0,25	0,03
AD-67174	3	0,22	0,05
AD-66922	1	0,26	0,06
AD-67008	3	0,50	0,18
AD-67007	3	0,21	0,02
AD-67006	3	0,50	0,18
AD-66920	1	0,25	0,05
AD-65695	1	0,49	0,15
AD-67028	3	0,47	0,04

В другом эксперименте дополнительный поднабор дополнительных средств, перечисленных в таблицах 7А, 7В и 7С, анализировали у мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3. Модифицированные нуклеотидные последовательности смысловой и антисмысловой нитей с этими последовательностями представлены в таблицах 10А и 10В. Вкратце, и как описано выше, в день -14 до приема дозы мышей дикого типа (C57BL/6) инфицировали путем внутривенного введения 1×10^{11} вирусных частиц. В день 0 мышам вводили одну дозу 1 мг/кг или 3 мг/кг средств. Сыворотку крови собирали у животных до приема дозы и в дни 14 и 28 после приема дозы, и уровень ANGPTL3 мыши и человека определяли с помощью анализов ELISA, как описано выше.

Результаты этих анализов в день 14 после приема дозы представлены в таблице 11 ниже и на фигуре 18А, а результаты

этих анализов в день 28 после приема дозы представлены в таблице 12 ниже и на фигуре 18В. Результаты демонстрируют, что средства AD-66921, AD-66916 и AD-67042 характеризовались улучшенной продолжительностью нокдауна ANGPTL3 человека.

Таблица 10А

ID дуплекса	Смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ NO	ID	Антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ NO
AD-67013	usgsucadCuudCaacucaa (Cgn) ucaaL96	418		usdTsgaguugagudTcdAagugacas usa	430
AD-67014	usgsucadCuudCaacucaa (Cgn) ucaaL96	419		us (Ufms) gaguugagudTcdAaguga casusa	431
AD-66921	usgsucacUfuGfAfAfcucaacuc aaL96	420		usUfsgagUfuGfAfguucAfaGfuga casusa	432
AD-66974	asascuaacuuaacuaau (Tgn) ca aaL96	421		usdTsgaauuaagdTudAguuaguus gsc	433
AD-66973	asascudAacuuaacuaau (Tgn) c aaaL96	422		usdTsgaauuaagdTudAguuaguus gsc	434
AD-66916	asascuaaCfuAfAfCfuuaauuca aaL96	423		usUfsugaAfuUfAfaguuAfgUfuag uusgsc	435
AD-66925	csusccauAfgUfGfAfagcaaucu aaL96	424		usUfsagaUfuGfCfuucaCfuAfugg agsusa	436
AD-67042	csusccadTagdAgaagcaa (Tgn) cuaaL96	425		usdTsgauugcuudCadCuauggags usa	437
AD-66923	ascsauauUfuGfAfUfcagucuuu uuL96	426		asAfsaaaGfaCfUfgaucAfaAfuau gusug	438
AD-67026	ascsauauUfuGfAfUfcagucuuu uuL96	427		asdAsaaagacugadTcdAaaauaugus usg	439
AD-67027	ascsauadTuudCaucaguc (Tgn) uuuuL96	428		asAfsaaaGfacugaucAfaAfuau susg	440
AD-67028	ascsauadTuudCaucaguc (Tgn) uuuuL96	429		asdAsaaagacugadTcdAaaauaugus usg	441

Таблица 10В

ID дуплекса	Смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ NO	ID	Антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ NO
AD-67013	usgsucadCuudCaacucaa (Cgn) ucaa	418		usdTsgaguugagudTcdAagugacas usa	430
AD-67014	usgsucadCuudCaacucaa (Cgn) ucaa	419		us (Ufms) gaguugagudTcdAaguga casusa	431
AD-66921	usgsucacUfuGfAfAfcucaacuc aa	420		usUfsgagUfuGfAfguucAfaGfuga casusa	432
AD-66974	asascuaacuuaacuaau (Tgn) ca aa	421		usdTsgaauuaagdTudAguuaguus gsc	433
AD-66973	asascudAacuuaacuaau (Tgn) c aaa	422		usdTsgaauuaagdTudAguuaguus gsc	434
AD-66916	asascuaaCfuAfAfCfuuaauuca aa	423		usUfsugaAfuUfAfaguuAfgUfuag uusgsc	435
AD-66925	csusccauAfgUfGfAfagcaaucu aa	424		usUfsagaUfuGfCfuucaCfuAfugg agsusa	436
AD-67042	csusccadTagdAgaagcaa (Tgn) cuaa	425		usdTsgauugcuudCadCuauggags usa	437
AD-66923	ascsauauUfuGfAfUfcagucuuu uu	426		asAfsaaaGfaCfUfgaucAfaAfuau gusug	438
AD-67026	ascsauauUfuGfAfUfcagucuuu uu	427		asdAsaaagacugadTcdAaaauaugus usg	439
AD-67027	ascsauadTuudCaucaguc (Tgn) uuuu	428		asAfsaaaGfacugaucAfaAfuau susg	440

AD-67028	ascsauadTuudCaucaguc (Tgn) uuuu	429	asdAsaaagacugadTcdAaauaugus usg	441
----------	------------------------------------	-----	------------------------------------	-----

Таблица 11

		День 14, по сравнению с PBS	
		ANGPTL3 человека	
siRNA	Доза (мг/кг)	Среднее	SD
PBS	0	1,00	0,12
AD-67013	3	0,86	0,06
AD-67014	3	0,67	0,15
AD-66921	1	0,44	0,18
AD-66974	3	0,75	0,03
AD-66973	3	0,76	0,05
AD-66916	1	0,41	0,05
AD-66925	1	0,65	0,13
AD-67042	3		
AD-65695	1	0,59	0,19
AD-66923	1	0,64	0,25
AD-67026	3	0,56	0,03
AD-67027	3	0,66	0,23
AD-67028	3	0,65	0,21

Таблица 12

		День 28, по сравнению с PBS	
		ANGPTL3 человека	
siRNA	Доза (мг/кг)	Среднее	SD
PBS	0	1,00	0,12
AD-67013	3	1,50	1,28
AD-67014	3	0,90	0,23
AD-66921	1	0,44	0,11
AD-66974	3	0,96	0,10
AD-66973	3	1,00	0,34
AD-66916	1	0,57	0,06
AD-66925	1	1,01	0,28
AD-67042	3		
AD-65695	1	0,85	0,17
AD-66923	1	0,85	0,25
AD-67026	3	0,64	0,06
AD-67027	3	0,58	0,11
AD-67028	3	1,32	1,01

Пример 8. Сайленсинг ANGPTL3 *in vivo* у отличных от человека приматов

Самцам макаков-крабоедов (n=3/группа) подкожно вводили одну дозу 1 мг/кг AD-65695 или AD-66920 или одну дозу 3 мг/кг AD-66920 в день 1. Сыворотку крови натошак собирали в дни 4, 8, 11, 15 и 22 после приема дозы, и измеряли уровень белка ANGPTL3 и уровни липидов сыворотки крови.

Результаты этих анализов представлены на фигурах 19A и 19B и демонстрируют, что после введения одной дозы 3 мг/кг AD-66920

(h/cy) наблюдались нокдаун сывороточного белка ANGPTL3 величиной до 80% и приблизительно 50% снижение уровня сывороточных триглицеридов. Одна доза 1 мг/кг AD-66920 оказывала умеренный эффект на уровень сывороточных триглицеридов. На удивление, хотя введение одной дозы 1 мг/кг AD-65695 приводило к снижению уровней белка ANGPTL3 до уровня, сходного с таковым при введении одной дозы 1 мг/кг AD-66920, одна доза 1 мг/кг AD-65695 была приблизительно в три раза менее действенной, чем одна доза 1 мг/кг AD-66920, в модели на мышах, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3, и не оказывала эффект в отношении сывороточных триглицеридов.

Пример 9. Сайленсинг ANGPTL3 *in vivo* у мышей, инфицированных AAV-TBG-ANGPTL3

Эффективность *in vivo* дополнительного набора средств, целенаправленно воздействующих на ANGPTL3, анализировали у мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3. Модифицированные нуклеотидные последовательности смысловой и антисмысловой нитей с этими последовательностями представлены в таблицах 13А и 13В. Вкратце, и как описано выше, в день -21 до приема дозы мышей дикого типа (C57BL/6; n=3) инфицировали путем внутривенного введения 1×10^{11} вирусных частиц. В день 0 мышам вводили одну дозу 1 мг/кг средств. Сыворотку крови собирали у животных до приема дозы и в день 28 после приема дозы, и уровень ANGPTL3 человека определяли с помощью анализов ELISA, как описано выше.

Результаты этих анализов представлены на фигуре 20 и демонстрируют, что эти средства обеспечивают эффективный нокдаун уровней белка ANGPTL3 человека.

Дополнительный набор средств, целенаправленно воздействующих на ANGPTL3, перечисленных в таблицах 13А и 13В, анализировали в отношении эффективности *in vivo* у мышей, инфицированных AAV8-TBG-ANGPTL3. Как описано выше, в день -21 до приема дозы мышей дикого типа (C57BL/6; n=3) инфицировали путем внутривенного введения 1×10^{11} вирусных частиц. В день 0 мышам вводили одну дозу 1 мг/кг средств. Сыворотку крови собирали у животных до приема дозы и в день 28 после приема дозы, и уровень

ANGPTL3 человека и мыши определяли с помощью анализов ELISA, как описано выше.

Результаты этих анализов представлены на фигурах 21A и 21B и демонстрируют, что эти средства обеспечивают эффективный нокдаун уровней белка ANGPTL3 мыши и человека.

Пример 10. Сайленсинг ANGPTL3 *in vitro* у мышей, инфицированных AAV-TBG-ANGPTL3

Дополнительные средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующие на ген ANGPTL3, синтезировали согласно описанному выше. Подробный перечень дополнительных немодифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей для ANGPTL3 показан в таблице 14, а подробный перечень модифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей этих дополнительных средств показан в таблицах 13A, 13B, 15A и 15B.

Эти дополнительные средства оценивали в анализах *in vitro* в Нер3В и первичных гепатоцитах макака-крабоеда посредством однократных трансфекций средствами при конечной концентрации дуплекса 10 нМ и 0,1 нМ. (смотри таблицу 16).

Клетки Нер3В культивировали и трансфицировали согласно описанному выше. После инкубирования со средствами против ANGPTL3 в течение 24 часов оценивали сайленсинг при свободном поглощении в первичных гепатоцитах макака-крабоеда. Способ был аналогичен описанному выше за исключением того, что 5 мкл полной среды для роста заменяли 5 мкл, содержащими Lipofectamine RNAiMax и OptiMEM. Результаты этих анализов (представленные в таблице 16) иллюстрируют, что многие дуплексы действительно ингибировали экспрессию мРНК ANGPTL3.

Таблица 13А. Дополнительные модифицированные средства для RNAi ANGPTL3

Название дуплекса	Смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO
AD-66920	asusuaagCfuCfCfUfucuuuuuuauuL96	442	asAfsuaaAfaAfGfaaggAfgCfuuaaususg	454
AD-72868	asusuaagCfuCfCfUfucuuuuuuauaL96	443	VP (Tams) AfsuaaAfaAfGfaaggAfgCfuuaaususg	455
AD-72869	asusuaagcuCfcUfucuuuuuuauuL96	444	asAfsuaaaaagaaGfgAfgcuuaaususg	456
AD-72870	asusuaagcuCfcUfucuuuuuuauuL96	445	asAfsuaaaaagaadGgAfgcuuaaususg	457
AD-72871	asusuaagcuCfcUfucuuu (Tgn) uauuL96	446	asAfsuaaaaagaaGfgAfgcuuaaususg	458
AD-72872	asusuaagcuCfcUfucuaauauauuL96	447	asAfsuaaaaagaaGfgAfgcuuaaususg	459
AD-65695	ascsauauUfuGfAfUfcagucuuuuuL96	448	asAfsaaaGfacugaucAfaAfuaugusug	460
AD-72873	ascsauauUfuGfAfUfcagucuuuuuL96	449	VP (Tams) AfsaaaGfacugaucAfaAfuaugusug	461
AD-72874	ascsauauuuGfaUfcagucuuuuuL96	450	asAfsaaagacugaUfcAfaauaugusug	462
AD-72875	ascsauauuuGfaUfcagucuuuuuL96	451	asAfsaaagacugadTcAfaauaugusug	463
AD-72876	ascsauauuuGfaUfcaguc (Tgn) uuuuL96	452	asAfsaaagacugaUfcAfaauaugusug	464
AD-72877	ascsauauuuGfaUfcagacauuuuL96	453	asAfsaaagacugaUfcAfaauaugusug	465

Таблица 13В. Дополнительные модифицированные средства для RNAi ANGPTL3

Название дуплекса	Смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO
AD-66920	asusuaagCfuCfCfUfucuuuuuuauu	442	asAfsuaaAfaAfGfaaggAfgCfuuaaususg	454
AD-72868	asusuaagCfuCfCfUfucuuuuuuaua	443	VP (Tams) AfsuaaAfaAfGfaaggAfgCfuuaaususg	455
AD-72869	asusuaagcuCfcUfucuuuuuuauu	444	asAfsuaaaaagaaGfgAfgcuuaaususg	456
AD-72870	asusuaagcuCfcUfucuuuuuuauu	445	asAfsuaaaaagaadGgAfgcuuaaususg	457
AD-72871	asusuaagcuCfcUfucuuu (Tgn) uauu	446	asAfsuaaaaagaaGfgAfgcuuaaususg	458
AD-72872	asusuaagcuCfcUfucuaauauauu	447	asAfsuaaaaagaaGfgAfgcuuaaususg	459
AD-65695	ascsauauUfuGfAfUfcagucuuuuu	448	asAfsaaaGfacugaucAfaAfuaugusug	460
AD-72873	ascsauauUfuGfAfUfcagucuuuuu	449	VP (Tams) AfsaaaGfacugaucAfaAfuaugusug	461
AD-72874	ascsauauuuGfaUfcagucuuuuu	450	asAfsaaagacugaUfcAfaauaugusug	462
AD-72875	ascsauauuuGfaUfcagucuuuuu	451	asAfsaaagacugadTcAfaauaugusug	463
AD-72876	ascsauauuuGfaUfcaguc (Tgn) uuuu	452	asAfsaaagacugaUfcAfaauaugusug	464
AD-72877	ascsauauuuGfaUfcagacauuuu	453	asAfsaaagacugaUfcAfaauaugusug	465

Таблица 14 Дополнительные немодифицированные средства для RNAi ANGPTL3

Название дуплекса	Смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO	Положение-мишень для антисмысловой нити NM 014495.3
AD-66916	AACUAACUAACUUAUUCAAA	466	UUUGAAUUAAGUUAGUUAGUUGC	507	480-502
AD-66922	GAAUAUGUCACUUGAACUCAA	467	UUGAGUUCAAGUGACAUUUCUU	508	391-413
AD-74755	AAACUCUAAACUUGACUAAAU	468	AUUUAGUCAAGUUUAGAGUUUUA	509	1853-1874
AD-74756	AACUAACUUAUUCAAAAUCA	469	UGAUUUUGAAUUAAGUUAGUUAG	510	515-536
AD-74757	CCAGAAGUAACUUCACUAAAA	470	UUUAAGUGAAGUUACUUCUGGGU	511	555-576
AD-74758	GAACUCAACUCAAACUUGAA	471	UUCAAGUUUUGAGUUGAGUUCAA	512	435-456
AD-74759	CAACUCAAACUUGAAAGCCU	472	AGGCUUUCAAGUUUUGAGUUGAG	513	440-461
AD-74760	UUCCACGUUGCUUGAAUUGA	473	UCAUUUUCAAGCAACGUGGAACU	514	46-67
AD-74761	GUUGCUUGAAUUGAAAAUCA	474	UGAUUUUCAUUUCAAGCAACGU	515	52-73
AD-74762	GAUCACAAAACUUCAAUGAAA	475	UUUCAUUGAAGUUUUGUGAUCCA	516	952-973
AD-74763	UCAAGAUUUGCUAUGUUAGAA	476	UUCUAACAUAGCAAUCUUGAUU	517	183-204 C21A
AD-74764	CAAAAUCAAGAUUUGCUAUGU	477	ACAUAGCAAUCUUGAUUUUGGC	518	178-199
AD-74765	GAACUACUCCUUCUUCAGU	478	ACUGAAGAAAGGGAGUAGUUCUU	519	751-772
AD-74766	AGAAAUUUCUCUAUCUCCAA	479	UUGGAAGAUAGAGAAAUUUCUGU	520	716-737
AD-74767	UGAACUGAGGCAAUUUAAAA	480	UUUUAAAUUUGCCUCAGUUCAUU	521	1461-1482
AD-74768	CAUCCAACAGAUUCAGAAAGA	481	UCUUUCUGAAUCUGUUGGAUGGA	522	1434-1455 C21A
AD-74769	AAAAUCAAGAUUUGCUAUGUU	482	AACAUAGCAAUCUUGAUUUUGG	523	179-200
AD-74770	AGAGCAAAUCUAAGCCAGAA	483	UUCUGGCUUAGAUUUUGCUCUUG	524	1341-1362 G21A
AD-74771	AUCAUAUGAGCUAAUAUCACA	484	UGUGAUUUAGCUCAUAUGAUGC	525	1798-1819
AD-74772	AAUAAACCUCGUAACAAGUUA	485	UAACUUGUUACGAGGUUUUUUC	526	2339-2360
AD-74773	CAACAGCAUAGUCAAAUAAAA	486	UUUUUUUUGACUAUGCUGUUGGU	527	651-672
AD-74774	AAAACAACCUAAUUGGUAAAU	487	AUUUACCAUUUAGGUUGUUUUUCU	528	1309-1330
AD-74775	CACUAAAAACUUUUGUAGAAA	488	UUUCUACAAAAGUUUUUAGUGAA	529	568-589
AD-74776	AUUAAAAUAAGUUCGCUGUCU	489	AGACAGCGAACUUUUUUAAUAC	530	2070-2091
AD-74777	CAAAACUUCAAUGAAACGUGA	490	UCACGUUUCAUUGAAGUUUUGUG	531	957-978 G21A
AD-74778	AGAUGGAUCACAAAACUUCAA	491	UUGAAGUUUUGUGAUCCAUCUAU	532	947-968

AD-74779	CACUUAUACUAUGAAAACAA	492	UUGUUUUCAUAGUAUUAAGUGUU	533	2194-2215
AD-74780	ACUAAGUCACAUUGACUUUAA	493	UUAAGUCAAGUGACUUAGUAG	534	2111-2132
AD-74781	UAUUAAAUAACUUUUCUAAAU	494	AUUUAGAAAAGUUUUUAAUAAG	535	1746-1767
AD-74782	ACACUUAUACUAUGAAAACA	495	UGUUUUCAUAGUAUUAAGUGUUA	536	2193-2214
AD-74783	UUUAUGAAACCUGAUGAAGCA	496	UGCUUCAUUAGGUUUCUAAAUA	537	2035-2056
AD-74784	CAAACAUUAUUAUGAAUUA	497	UAAUAUUCAAUUAUUAUGUUUGU	538	1103-1124 C21A
AD-74785	AAACCAGUGAAAUCAAAGAAA	498	UUUCUUUGAUUUCACUGGUUUGC	539	343-364 G21A
AD-74786	GAGUUAAGUUUAUUAUUCCA	499	UGGAAUAUAAACUUUAACUCGA	540	2271-2292 C21A
AD-74787	CCAAUUAUAAACAAUUAACCA	500	UGGUUUAAUUGUUUAUUAUGGUC	541	632-653
AD-74788	GUGGAGAAAACAACCUAAUA	501	UAUUUAGGUUGUUUUCUCCACAC	542	1303-1324 G21A
AD-74789	AACUCAACUCAAACUUGAAA	502	UUUCAAGUUUUGAGUUGAGUUA	543	436-457
AD-74790	AAUGUUCACAAUUAAGCUCCU	503	AGGAGCUAAUUGUGAACAUUUU	544	80-101
AD-74791	GCAGAAUUAUUAACUGUAUUA	504	UAAUACAGUAUUUAUUCUGCUU	545	2053-2074
AD-74792	UGAAUGAAAUAAGAAUGUAA	505	UUACAUUUCUUAUUUCAUUAAC	546	772-793
AD-74793	UACAUUAUAAACUACAAGUCA	506	UUGACUUGUAGUUUAUUAUGUAGU	547	386-407

Таблица 15А. Дополнительные модифицированные средства для RNAi ANGPTL3

Название дуплекса	Смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO:	Последовательность-мишень МРНК в NM 014495.3	SEQ ID NO:
AD-66916	asascuaaCfuAfAfCfuuaaucaa aL96	548	usUfsugaAfuUfAfaguuAfgUfuaguusgs c	589	GCAACUAACUAACUUAUUAUCAA A	630
AD-66922	gsasauauGfuCfAfCfuugaacuca aL96	549	usUfsgagUfuCfAfagugAfcAfuaucsus u	590	AAGAAUAUGUCACUUGAACUCA A	631
AD-74755	asasacucUfaAfAfCfuugacuaaaa uL96	550	asUfsuuaGfuCfAfaguuUfaGfaguuuusus a	591	UAAAACUCUAAACUUGACUAAA U	632
AD-74756	asascuaaCfuUfAfAfuaaaaauc aL96	551	usGfsauuUfuGfAfauuaAfgUfuaguusas g	592	CUAACUAACUUAUUAUUAUUAUUAUC A	633
AD-74757	cscsagaaGfuAfAfCfuucacuuuaa aL96	552	usUfsuaaGfuGfAfaguuAfcUfucuggsgs u	593	ACCCAGAAGUAACUUCACUUA A	634
AD-74758	gsasacucAfaCfUfCfaaaacuuga aL96	553	usUfscaaGfuUfUfugagUfuGfaguucsas a	594	UUGAACUCAACUCAAACUUGA A	635
AD-74759	csasacucAfaAfAfCfuugaagcc uL96	554	asGfsgcuUfuCfAfaguuUfuGfaguugsas g	595	CUCAACUCAAACUUGAAAGCC U	636
AD-74760	ususccacGfuUfGfCfuugaaaauug	555	usCfsaauUfuCfAfagcaAfcGfuggaascscs	596	AGUUCCACGUUGCUUGAAAUUG	637

	aL96		u		A	
AD-74761	gsusugcuUfgAfAfAfugaaaauc aL96	556	usGfsauuUfuCfAfauuuCfaAfgcaacs gsu	597	ACGUUGCUGAAAAUUGAAAAUC A	638
AD-74762	gsasucacAfaAfAfCfuucaaugaa aL96	557	usUfsucaUfuGfAfaguuUfuGfugauc scsa	598	UGGAUCACAAAACUCAAUGAA A	639
AD-74763	uscsaagaUfuUfGfCfuauguuaga aL96	558	usUfscuaAfcAfUfagcaAfaUfcuugas usu	599	AAUCAAGAUUUGCUAUGUUAGA C	640
AD-74764	csasaaaCfaAfGfAfuuugcuau g uL96	559	asCfsauaGfcAfAfaucuUfgAfuuuug sgsc	600	GCCAAAUCAAGAUUUGCUAUG U	641
AD-74765	gsasacuaCfuCfCfCfuucucag uL96	560	asCfsugaAfgAfAfagggAfgUfaguuc sus u	601	AAGAACUACUCCCUUUCUUCAG U	642
AD-74766	asgsaaaUfuCfUfCfuaucucca aL96	561	usUfsggaAfgAfUfagagAfaAfuuuc sgsu	602	ACAGAAAUUCUCUAUCUCCA A	643
AD-74767	usgsaacuGfaGfGfCfaaauuuaa aL96	562	usUfsuuaAfaUfUfugccUfcAfguuc asusu	603	AAUGAACUGAGGCAAAUUUAAA A	644
AD-74768	csasuccaAfcAfGfAfuaucagaa g aL96	563	usCfsuuuCfuGfAfaucuGfuUfggaug sgsa	604	UCCAUCCAACAGAUUCAGAAAG C	645
AD-74769	asasaauCfaGfAfUfuugcuau gu uL96	564	asAfscauAfgCfAfaaucUfuGfauuu sgsg	605	CCAAAUCAAGAUUUGCUAUGU U	646
AD-74770	asgsagcaAfaAfUfCfuaagccaga aL96	565	usUfscugGfcUfUfagauUfuUfgcuc usus g	606	CAAGAGCAAAUCUAAGCCAGA G	647
AD-74771	asuscauaUfgAfGfCfuaauaucac aL96	566	usGfsugaUfaUfUfagcuCfaUfaugau sgsc	607	GCAUCAUAUGAGCUAAUAUCAC A	648
AD-74772	asasuaaaCfcUfCfGfuaacaagu u aL96	567	usAfsacuUfgUfUfacgaGfgUfuua uususc	608	GAAUAAAACCUCGUAACAAGUU A	649
AD-74773	csasacagCfaUfAfGfucaaauaa a aL96	568	usUfsuuaUfuUfGfacuaUfgCfuguu sgsu	609	ACCAACAGCAUAGUCAAAUAAA A	650
AD-74774	asasaacaAfcCfUfAfaaugguaaa uL96	569	asUfsuuaCfcAfUfuuaGfuUfguuu uscsu	610	AGAAAACAACCUAAAUGGUAAA U	651
AD-74775	csascuuaAfaAfCfUfuuguagaa aL96	570	usUfsucuAfcAfAfaaguUfuUfaagug sas a	611	UUCACUUAACUUUUGUAGAA A	652
AD-74776	asusuaaaAfuAfAfGfuucgcuguc uL96	571	asGfsacaGfcGfAfacuuAfuUfuuaa sasac	612	GUAUUAAAAUAAGUUCGCUGUC U	653
AD-74777	csasaaacUfuCfAfAfugaaacgug aL96	572	usCfsacgUfuUfCfauugAfaGfuuuu sgsus g	613	CACAAAACUCAAUGAAACGUG G	654
AD-74778	asgsauggAfuCfAfCfaaaacuca aL96	573	usUfsgaaGfuUfUfugugAfuCfcauc usas u	614	AUAGAUGGAUCACAAAACUUCA A	655
AD-74779	csascuuaAfuAfCfUfaugaaaaca aL96	574	usUfsguuUfuCfAfuaGuAfuUfaagug sus u	615	AACACUUAUACUAUGAAAACA A	656

AD-74780	ascsuaagUfcAfCfAfuugacuuua aL96	575	usUfsaaaGfuCfAfauguGfaCfuuagusas g	616	CUACUAAGUCACAUUGACUUUA A	657
AD-74781	usasuuuaAfuAfAfCfuuuucuaaa uL96	576	asUfsuuaGfaAfAfaguuAfuUfuaauasas g	617	CUUAUUAAAUAACUUUUCUAAA U	658
AD-74782	ascsacuuAfaUfAfCfuaugaaaac aL96	577	usGfsuuuUfcAfUfaguaUfuAfagugusus a	618	UAACACUUAUACUAUGAAAAC A	659
AD-74783	ususuaugAfaAfCfCfuuaugaagc aL96	578	usGfscuuCfaUfUfagguUfuCfauaaaasus a	619	UAUUUAUGAAACCUAUUGAAGC A	660
AD-74784	csasaacaUfuAfUfAfuugaauuu aL96	579	usAfsauaUfuCfAfauauAfaUfguuugsus u	620	AACAAACAUUAUUAUUGAAUUAU C	661
AD-74785	asasaccaGfuGfAfAfaucaaagaa aL96	580	usUfsucuUfuGfAfuuuacAfcUfgguuusgs c	621	GCAAACCAGUGAAAUCAAGAA G	662
AD-74786	gsasguuaAfaGfUfUfuaauuuucc aL96	581	usGfsgaaAfuAfUfaaacUfuUfaacucsgs a	622	UCGAGUUAAAGUUUAUUAUUUCC C	663
AD-74787	cscsaauaUfaAfAfCfaauuaaacc aL96	582	usGfsguuUfaAfUfuguuUfaUfauuggsus c	623	GACCAUAUAAAACAAUUAACCC A	664
AD-74788	gsusggagAfaAfAfCfaaccuaaa aL96	583	usAfsuuuAfgGfUfuguuUfuCfuccacsas c	624	GUGUGGAGAAAACAACCUAUUAU G	665
AD-74789	asascucaAfcUfCfAfaaacuugaa aL96	584	usUfsucaAfgUfUfuugaGfuUfgaguuscs a	625	UGAACUCAACUCAAACUUGAA A	666
AD-74790	asasuguuCfaCfAfAfuaaagcucc uL96	585	asGfsgagCfuUfAfauugUfgAfacauusus u	626	AAAAUGUUCACAAUUAAGCUCC U	667
AD-74791	gscsagaaUfuAfAfAfuacuguauu aL96	586	usAfsauaCfaGfUfauuuAfaUfucugcsus u	627	AAGCAGAAUUAUUAACUGUAUU A	668
AD-74792	usgsaaugAfaAfUfAfagaaaugua aL96	587	usUfsacaUfuUfCfuuaUfuCfauucasas c	628	GUUGAAUGAAAUAAGAAAUGUA A	669
AD-74793	usascauaUfaAfAfCfuacaaguca aL96	588	usUfsgacUfuGfUfaguuUfaUfauguasgs u	629	ACUACAUUAUAAACUACAAGUCA A	670

Таблица 15В. Дополнительные модифицированные средства для RNAi ANGPTL3

Название дуплекса	Смысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность, 5'-3'	SEQ ID NO:	Последовательность- мишень МРНК NM 014495.3	SEQ ID NO:
AD-66916	asascuaaCfuAfAfCfuuaauuuaaa	548	usUfsugaAfuUfAfaguuAfgUfuaguusgsc	589	GCAACUAACUAACUUAUUAUUCAAA	630
AD-66922	gsasauauGfuCfAfCfuugaacucuaa	549	usUfsgagUfuCfAfagugAfcAfuauucsusu	590	AAGAAUAUGUCACUUGAACUCAA	631
AD-74755	asasacucUfaAfAfCfuugacuaaaau	550	asUfsuuaGfuCfAfaguuUfaGfaguususa	591	UAAACUCUAAACUUGACUAAAUA	632
AD-74756	asascuaaCfuUfAfAfuuaaaaauca	551	usGfsauuUfuGfAfauuaAfgUfuaguusasg	592	CUAACUAACUUAUUAUUAUUAUUA	633
AD-74757	cscsagaaGfuAfAfCfuucacuuuaa	552	usUfsuaaGfuGfAfaguuAfcUfucuggsgsu	593	ACCCAGAAGUAACUUCACUUAUA	634

AD-74758	gsasacucAfaCfUfCfaaaacuugaa	553	usUfscaaGfuUfUfugagUfuGfaguucsasa	594	UUGAACUCAACUCAAAACUUGAA	635
AD-74759	csasacucAfaAfAfCfuugaaagccu	554	asGfsgcuUfuCfAfaguuUfuGfaguugsasg	595	CUCAACUCAAAACUUGAAAGCCU	636
AD-74760	ususccacGfuUfGfCfuugaaaauuga	555	usCfsaauUfuCfAfagcaAfcGfuggaascsu	596	AGUUCCACGUUGCUGAAAAUUGA	637
AD-74761	gsusugcuUfgAfAfAfuugaaaauca	556	usGfsauuUfuCfAfauuuCfaAfgcaacsgsu	597	ACGUUGCUUGAAAAUUGAAAAUCA	638
AD-74762	gsasucacAfaAfAfCfuucaaugaaa	557	usUfsucaUfuGfAfaguuUfuGfugaucscsa	598	UGGAUCACAAAACUUCAAUGAAA	639
AD-74763	uscsaagaUfuUfGfCfuauguuagaa	558	usUfscuaAfcAfUfagcaAfaUfcuugasusu	599	AAUCAAGAUUUGCUAUGUUAGAC	640
AD-74764	csasaaauCfaAfGfAfuuugcuauugu	559	asCfsauaGfcAfAfaucUfgAfuuuugsgsc	600	GCCAAAAUCAAGAUUUGCUAUGU	641
AD-74765	gsasacuaCfuCfCfCfuuuucuucagu	560	asCfsugaAfgAfAfagggAfgUfaguucsusu	601	AAGAACUACUCCCUUUCUUCAGU	642
AD-74766	asgsaaaUfuCfUfCfuaucuuccaa	561	usUfsggaAfgAfUfagagAfaAfuuuucsgsu	602	ACAGAAAUUCUCUAUCUUCCAA	643
AD-74767	usgsaacuGfaGfGfCfaaaauuuaaaa	562	usUfsuuaAfaUfUfugccUfcAfguucasusu	603	AAUGAACUGAGGCAAAUUAUAAA	644
AD-74768	csasuccaAfcAfGfAfuucagaaaga	563	usCfsuuuCfuGfAfaucGfuUfggaugsgsa	604	UCCAUCCAACAGAUUCAGAAAGC	645
AD-74769	asasaaucAfaGfAfUfuugcuauugu	564	asAfscauAfgCfAfaucUfuGfauuuusgsg	605	CCAAAAUCAAGAUUUGCUAUGUU	646
AD-74770	asgsagcaAfaAfUfCfuaagccagaa	565	usUfscugGfcUfUfagauUfuUfgcucususg	606	CAAGAGCAAAAUCUAAGCCAGAG	647
AD-74771	asuscauaUfgAfGfCfuaauaucaca	566	usGfsugaUfaUfUfagcuCfaUfaugausgsc	607	GCAUCAUAUGAGCUAAUAUCACA	648
AD-74772	asasuaaaCfcUfCfGfuaacaaguua	567	usAfsacuUfgUfUfacgaGfgUfuauuususc	608	GAAAUAAACCUCGUAACAAGUUA	649
AD-74773	csasacagCfaUfAfGfucaaaauaaaa	568	usUfsuuaUfuUfGfacuaUfgCfuguugsgsu	609	ACCAACAGCAUAGUCAAAUAAAA	650
AD-74774	asasaacaAfcCfUfAfaaugguaaaau	569	asUfsuuaCfcAfUfuuagGfuUfguuuuscsu	610	AGAAAACAACCUAAAUGGUAAAAU	651
AD-74775	csascuuaAfaAfCfUfuuuuguagaaa	570	usUfsucuAfcAfAfaaguUfuUfaagugsasa	611	UUCACUUA AAAACUUUUGUAGAAA	652
AD-74776	asusuaaaAfuAfAfGfuucgcugucu	571	asGfsacaGfcGfAfacuuAfuUfuuaausasc	612	GUAUUAAAAUAAGUUCGCUGUCU	653
AD-74777	csasaaacUfuCfAfAfugaaacguga	572	usCfsacgUfuUfCfaugAfaGfuuuugsusg	613	CACAAAACUUCAAUGAAACGUGG	654
AD-74778	asgsauggAfuCfAfCfaaaacuucua	573	usUfsgaaGfuUfUfugugAfuCfcaucusasu	614	AUAGAUGGAUCACAAAACUUCAA	655
AD-74779	csascuuaAfuAfCfUfaugaaaacaa	574	usUfsguuUfuCfAfuaguAfuUfaagugsusu	615	AACACUUAUACUAUGAAAACAA	656
AD-74780	ascsuaagUfcAfCfAfuugacuuuaa	575	usUfsaaaGfuCfAfauguGfaCfuuagusasg	616	CUACUAAGUCACAUUGACUUUAA	657
AD-74781	usasuuuaAfuAfAfCfuuuucuaaaau	576	asUfsuuaGfaAfAfaguuAfuUfuauuasasg	617	CUUAUUAAAAUAACUUUUCUAAAAU	658
AD-74782	ascsacuuAfaUfAfCfuaugaaaaca	577	usGfsuuuUfcAfUfaguaUfuAfagugususa	618	UAACACUUAUACUAUGAAAAACA	659
AD-74783	ususuaugAfaAfCfCfuaaugaagca	578	usGfscuuCfaUfUfagguUfuCfauaaasusa	619	UAUUUAUGAAACCUAUGAAGCA	660
AD-74784	csasaacaUfuAfUfAfuugaaauauua	579	usAfsauaUfuCfAfauauAfaUfguuugsusu	620	AACAAAACUUAUAUUGAAUAUUC	661
AD-74785	asasaccaGfuGfAfAfaucaaagaaa	580	usUfsucuUfuGfAfuuucAfcUfgguuusgsc	621	GCAAACCAGUGAAAUCAAGAAG	662
AD-74786	gsasguuaAfaGfUfUfuauauuuucca	581	usGfsgaaAfuAfUfaaacUfuUfaacucsgsa	622	UCGAGUUAAGUUUAUAUUUCCC	663
AD-74787	cscsaauaUfaAfAfCfaauuaaacca	582	usGfsguuUfaAfUfuguuUfaUfaauuggsusc	623	GACCAAUUAUAAACAAUUAACCA	664

AD-74788	gsusggagAfaAfAfCfaaccuaaaaua	583	usAfsuuuAfgGfUfuguUfuCfuccacsasc	624	GUGUGGAGAAAACAACCUGAAAUG	665
AD-74789	asascucaAfcUfCfAfaaacuugaaa	584	usUfsucaAfgUfUfuugaGfuUfgaguuscsa	625	UGAACUCAACUCAAAAACUUGAAA	666
AD-74790	asasuguuCfaCfAfAfuaaagcuccu	585	asGfsgagCfuUfAfauugUfgAfacauususu	626	AAAAUGUUCACAAUUAAGCUCCU	667
AD-74791	gscsagaaUfuAfAfAfuaacugauuaa	586	usAfsauaCfaGfUfauuuAfaUfucugcsusu	627	AAGCAGAAUUAUUACUGUAUUA	668
AD-74792	usgsaaugAfaAfUfAfagaaauguaa	587	usUfsacaUfuUfCfuauUfuCfauucasasc	628	GUUGAAUGAAAUAAGAAAUGUAA	669
AD-74793	usascauaUfaAfAfCfuacaagucaa	588	usUfsgacUfuGfUfaguUfaUfauguasgsu	629	ACUACAUAUAAACUACAAGUCA	670

Таблица 16 Скрининг ANGPTL3 с однократной дозой в клетках Нер3В и первичных гепатоцитах макака-крабоеда

Данные выражены в виде процентного количества оставшейся матричной РНК в сравнении с контрольным AD-1955, не осуществляющим целенаправленное воздействие.

ID дуплекса	Нер3В				Гепатоциты макака-крабоеда			
	10 нМ_AVG	10 нМ_STDEV	0,1 нМ_AVG	0,1 нМ_STDEV	10 нМ_AVG	10 нМ_STDEV	0,1 нМ_AVG	0,1 нМ_STDEV
AD-66916	5,2	2,1	17,9	4,1	5,2	0,4	40,5	5,4
AD-66922	12,5	2,1	41,5	17,0	4,6	0,6	43,5	8,2
AD-74755	18,2	5,9	44,3	3,5	68,7	7,8	79,2	11,5
AD-74756	10,4	4,1	56,9	12,5	9,9	2,4	50,7	7,4
AD-74757	10,7	6,5	38,3	12,4	5,6	0,8	34,5	4,0
AD-74758	19,3	3,1	120,4	19,5	24,1	6,9	78,4	17,7
AD-74759	20,4	3,9	132,1	34,5	26,7	4,0	80,4	8,3
AD-74760	21,6	4,7	140,1	16,8	12,8	1,5	72,5	6,4
AD-74761	19,9	2,4	107,8	30,0	12,6	1,1	71,9	12,3
AD-74762	11,0	5,0	55,0	11,0	6,4	1,2	78,5	17,1
AD-74763	13,5	4,1	67,5	13,6	21,2	5,2	76,8	13,4
AD-74764	10,4	3,0	70,7	21,4	15,8	1,4	63,1	4,8
AD-74765	16,5	3,6	83,1	16,4	22,0	2,5	82,2	10,4
AD-74766	11,3	6,2	56,0	25,3	7,8	0,4	51,3	2,1
AD-74767	8,6	3,2	70,9	19,7	14,8	5,8	61,5	4,7
AD-74768	28,8	10,1	120,3	24,3	37,6	5,3	81,1	9,6

AD-74769	14,5	5,5	65,4	28,5	10,3	1,6	63,5	8,9
AD-74770	42,4	13,0	95,0	23,6	59,8	8,1	104,6	14,8
AD-74771	30,0	12,2	79,7	15,3	73,7	10,0	87,6	17,1
AD-74772	22,9	3,8	60,4	10,9	80,9	9,1	83,8	8,0
AD-74773	11,2	3,3	47,4	14,1	9,7	1,8	56,3	1,8
AD-74774	57,3	4,8	99,3	8,1	65,0	4,2	81,3	9,3
AD-74775	13,8	3,6	83,1	21,8	54,2	4,0	92,0	5,5
AD-74776	50,6	11,5	114,3	39,7	80,2	11,0	97,3	9,4
AD-74777	14,8	3,8	76,7	27,0	39,4	12,1	92,1	4,2
AD-74778	22,0	13,0	62,8	24,6	15,6	3,0	70,4	7,4
AD-74779	45,5	9,0	64,7	4,7	82,8	15,1	87,0	9,0
AD-74780	38,3	13,9	81,0	22,9	77,4	7,4	82,0	4,3
AD-74781	44,5	10,1	78,5	15,9	79,5	3,3	88,7	7,9
AD-74782	59,1	18,5	137,3	65,4	79,1	3,6	88,5	4,3
AD-74783	115,4	42,4	109,6	32,6	91,8	5,6	95,3	9,2
AD-74784	11,5	4,6	47,8	18,3	8,6	2,8	56,7	10,7
AD-74785	15,0	13,9	43,9	7,4	12,1	2,6	72,4	14,0
AD-74786	32,1	10,3	61,0	14,6	85,5	7,2	93,3	22,2
AD-74787	60,9	12,4	86,4	26,2	88,1	11,9	96,6	21,4
AD-74788	17,8	7,7	69,9	23,8	19,3	1,2	79,2	15,3
AD-74789	30,6	3,6	64,0	6,9	24,6	1,3	76,0	9,5
AD-74790	15,4	3,5	56,9	10,5	9,2	0,6	58,7	12,4
AD-74791	30,7	6,3	49,3	6,9	81,3	8,3	87,3	3,8
AD-74792	10,5	2,4	30,1	6,4	10,5	1,2	54,7	7,3

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Двухнитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA) для ингибирования экспрессии ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3), где указанная dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевую область,

где антисмысловая нить содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от комплемента нуклеотидов 555-589 SEQ ID NO:1,

где каждая нить независимо имеет длину 17-25 нуклеотидов, и где по существу все нуклеотиды смысловой нити и по существу все нуклеотиды антисмысловой нити содержат нуклеотидную модификацию,

где по меньшей мере одна из нуклеотидных модификаций выбрана из группы, состоящей из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, модификации в виде нуклеотида, содержащего 5'-фосфотиоатную группу, модификации в виде нуклеотида, лишенного азотистого основания, и 2'-амино-модифицированного нуклеотида, и

где лиганд N-ацетилгалактозамина (GalNAc) конъюгирован по меньшей мере с одной нитью указанное дцРНК.

2. DsRNA по п. 1, где все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити содержат нуклеотидную модификацию являются модифицированными нуклеотидами.

3. DsRNA по п. 1 или 2, где все нуклеотиды содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации.

4. DsRNA по любому из пп. 1-3, дополнительно содержащая по меньшей мере одну фосфотиоатную межнуклеотидную связь.

5. DsRNA по п. 4, где фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной нити.

6. DsRNA по п. 5, где указанная нить представляет собой антисмысловую нить.

7. DsRNA по п. 4, где dsRNA содержит 6-8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей.

8. DsRNA по любому из пп. 1-7, где каждая нить имеет

независимо длину 19-25 нуклеотидов.

9. DsRNA по п. 8, где каждая нить имеет независимо длину 19-23 нуклеотидов.

10. DsRNA по п. 8, где каждая нить имеет независимо длину 21-23 нуклеотидов.

11. DsRNA по любому из пп. 1-10, где по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида.

12. DsRNA по п. 11, где по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

13. DsRNA по любому из пп. 1-12, где по меньшей мере один из 5'-конца или 3'-конца смысловой нити указанной dsRNA представляет собой тупой конец.

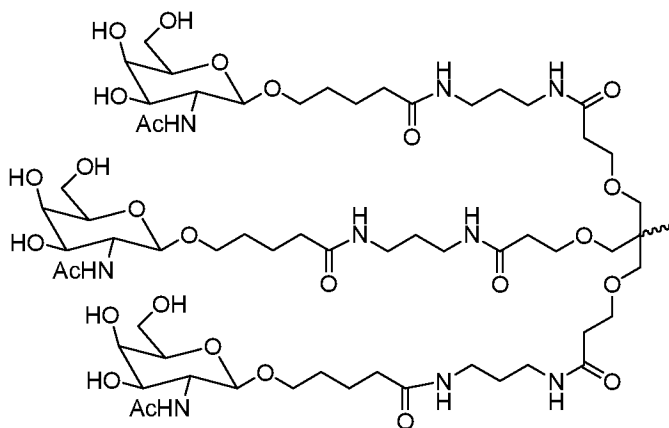
14. DsRNA по любому из пп. 1-13, где лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой нити dsRNA.

15. DsRNA по любому из пп. 1-14, где лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

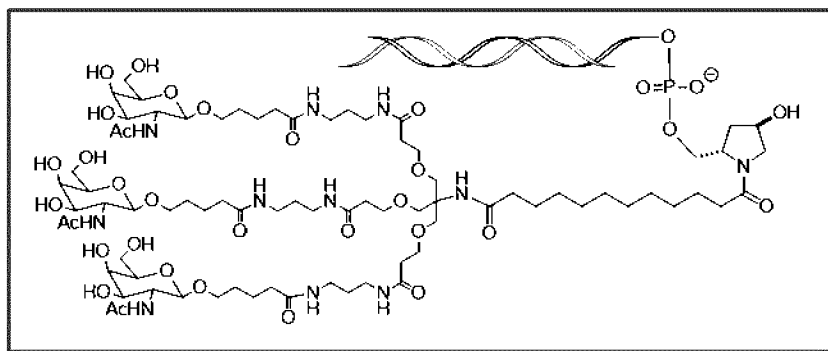
16. DsRNA по п. 15, где лиганд содержит одно или более производных GalNAc, присоединенные через линкер.

17. DsRNA по п. 16, где лиганд содержит одно или более производных GalNAc, присоединенные через бивалентный или тривалентный линкер.

18. DsRNA по п. 17, где лиганд представляет собой



19. DsRNA по п. 14, где dsRNA конъюгирована с лигандом в соответствии с показанным на следующей схеме:



20. DsRNA по любому из пп. 1-19, где нуклеотидная последовательность антисмысловой нити содержит нуклеотидную последовательность 5'-UUUAAGUGAAGUUACUUCUGGGU-3' (SEQ ID NO:511) или 5'-UUUCUACAAAAGUUUUAAGUGAA (SEQ ID NO:529).

21. DsRNA по любому из пп. 1-20, где смысловая и антисмысловая нити содержат нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

5'-CCAGAAGUAACUUCACUUAAA-3' (SEQ ID NO:470) и 5'-UUUAAGUGAAGUUACUUCUGGGU-3' (SEQ ID NO:511); и

5'-CACUUAAAACUUUUGUAGAAA-3' (SEQ ID NO:488) и 5'-UUUCUACAAAAGUUUUAAGUGAA-3' (SEQ ID NO:529).

22. DsRNA по любому из пп. 1-21, где двухнитевой участок имеет длину 17-23 пары нуклеотидов.

23. DsRNA по любому из пп. 1-21, где двухнитевой участок имеет длину 17-25 пар нуклеотидов.

24. Выделенная клетка, содержащая dsRNA по любому из пп. 1-23.

25. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена ANGPTL3, содержащая dsRNA по любому из пп. 1-23.

26. Фармацевтическая композиция по п. 25, дополнительно содержащая липидный состав.

27. Способ ингибирования экспрессии ANGPTL3 в клетке *in vitro*, при этом способ включает:

(a) приведение клетки в контакт с dsRNA по любому из пп. 1-23 и

(b) выдерживание клетки, полученной на стадии (a), в течение времени, достаточного для достижения разрушения мРНК-транскрипта гена ANGPTL3, за счет чего осуществляется ингибирование экспрессии

гена ANGPTL3 в клетке.

28. Способ по п. 27, где экспрессия ANGPTL3 ингибируется по меньшей мере на приблизительно 30%.

29. Способ лечения субъекта, имеющего нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии ANGPTL3, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества dsRNA по любому из пп. 1-23, за счет чего осуществляется лечение указанного субъекта.

30. Способ по п. 29, где нарушение представляет собой нарушение метаболизма липидов.

31. Способ по п. 30, где нарушение метаболизма липидов выбрано из группы, состоящей из гипертриглицеридемии, ожирения, гиперлипидемии, атеросклероза, диабета, сердечно-сосудистого заболевания или болезни коронарных артерий.

32. Способ по любому из пп. 29-31, дополнительно включающий введение дополнительного терапевтического средства указанному субъекту.

33. Способ по п. 32, где указанное дополнительное терапевтическое средство представляет собой статин.

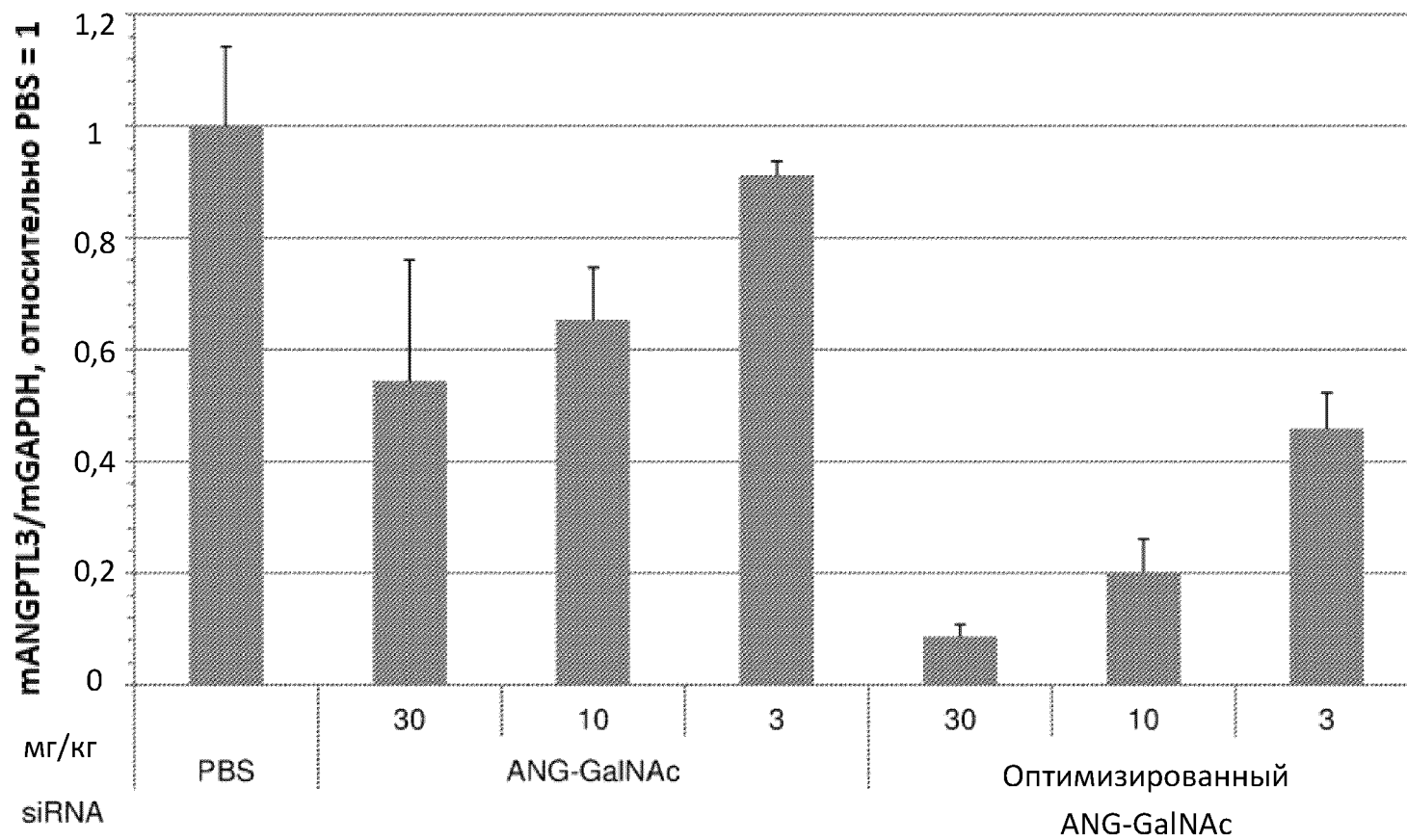
34. Способ по любому из пп. 29-33, где dsRNA вводят субъекту в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

35. Способ по п. 31, где введение dsRNA субъекту вызывает уменьшение уровня одного или нескольких липидов сыворотки крови и уменьшение накопления белка ANGPTL3.

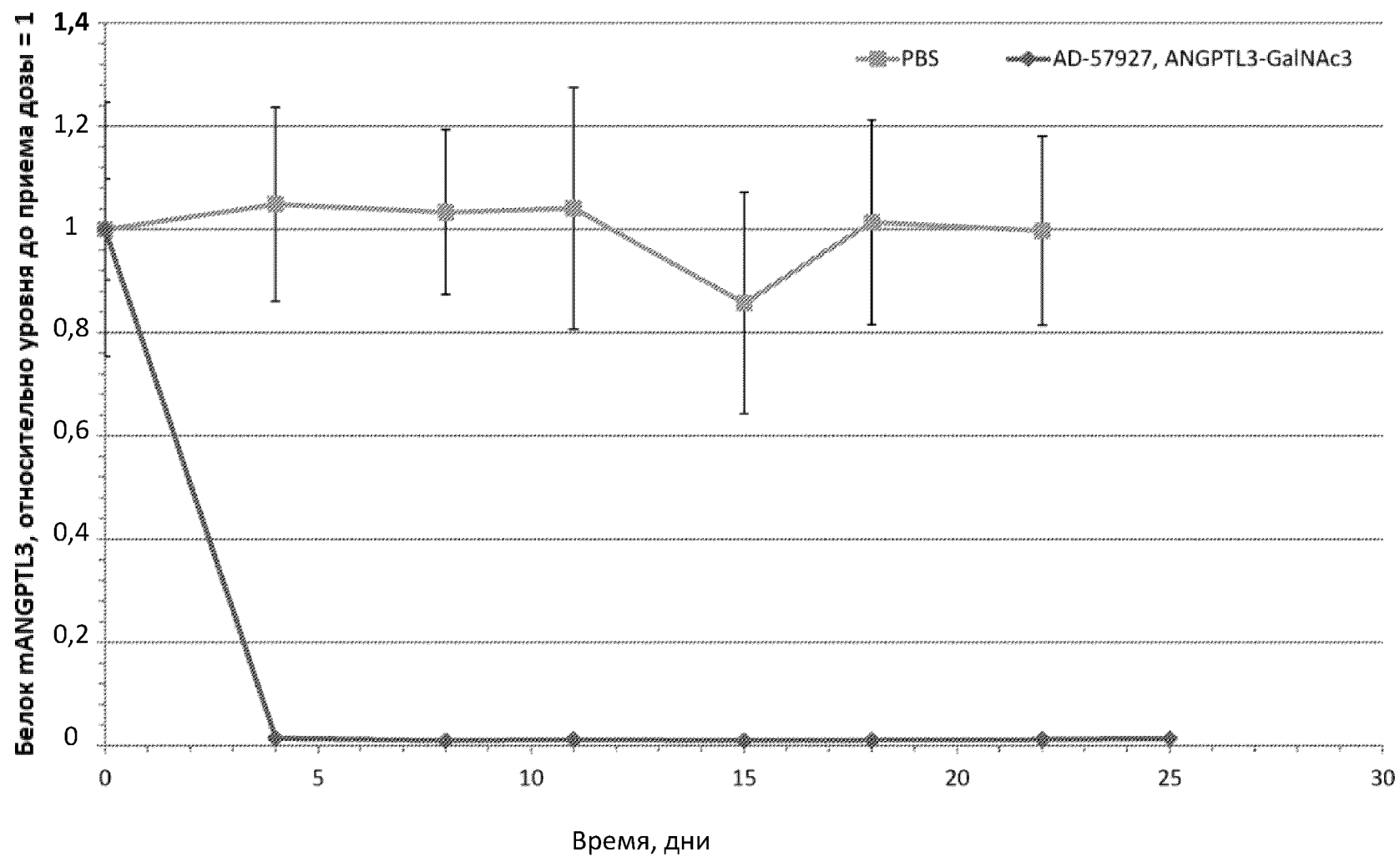
36. Способ ингибирования экспрессии ANGPTL3 у субъекта, при этом способ включает

введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества dsRNA по любому из пп. 1-23, за счет чего осуществляется ингибирование экспрессии ANGPTL3 у указанного субъекта.

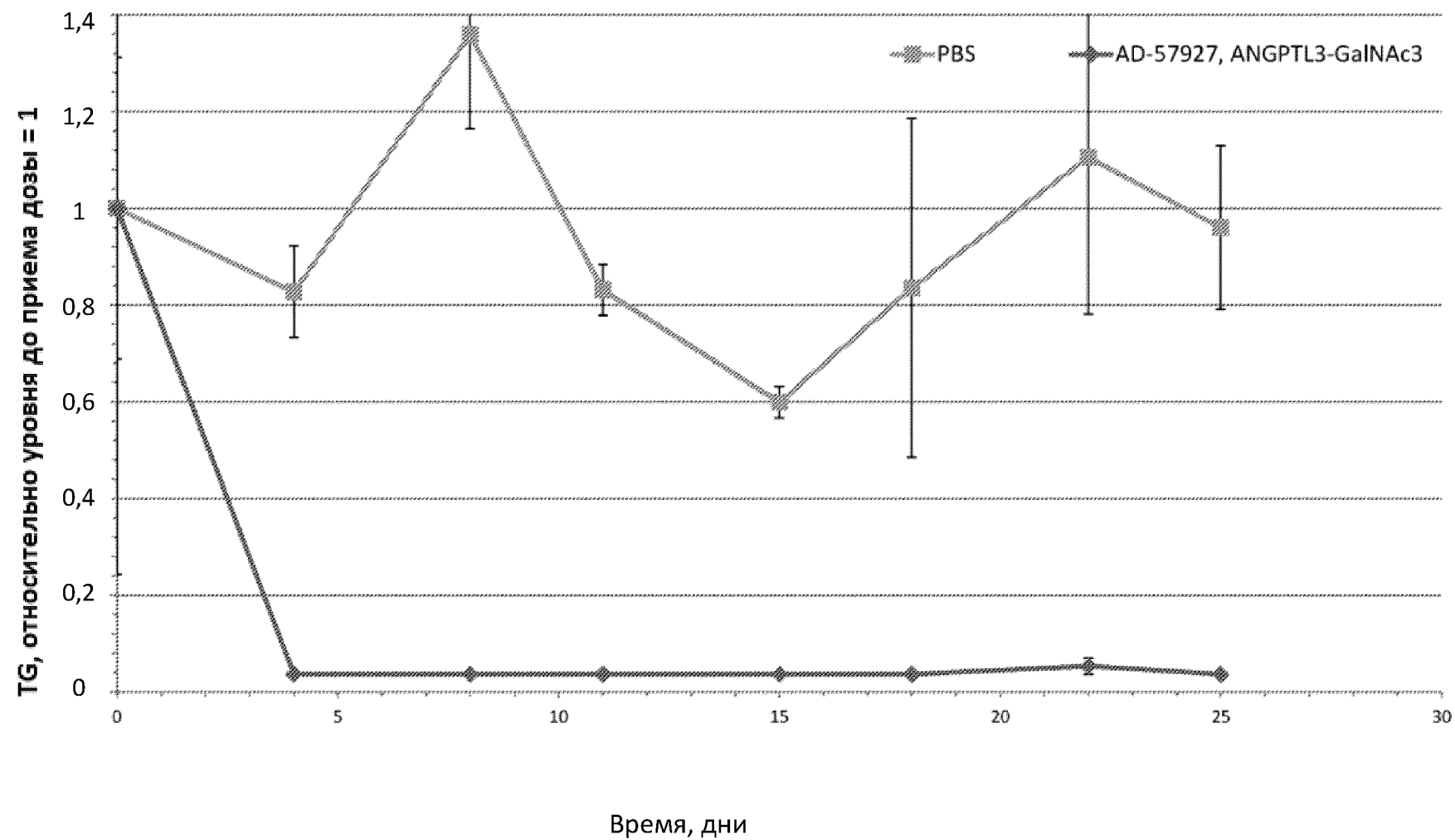
По доверенности



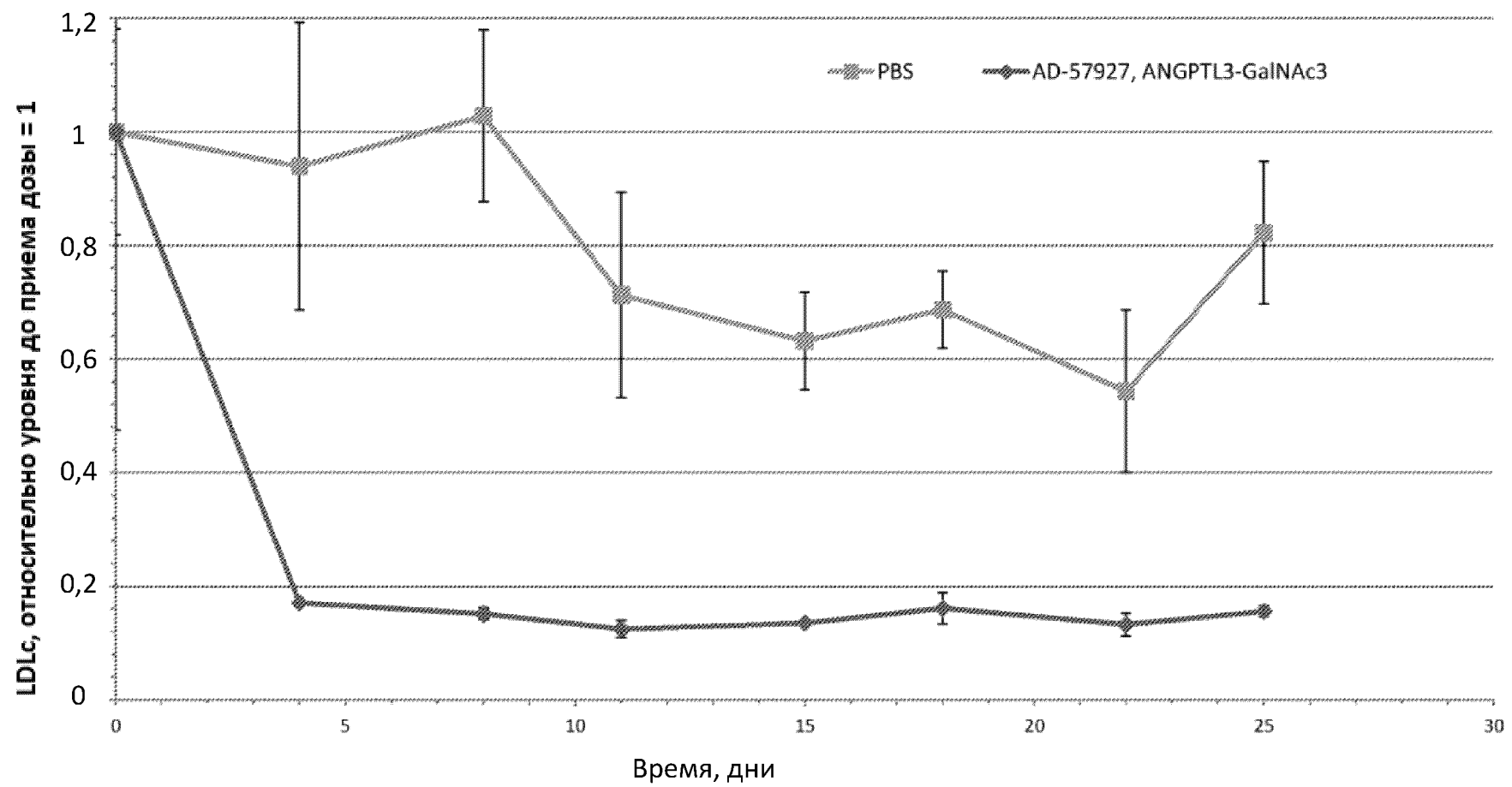
Фигура 1



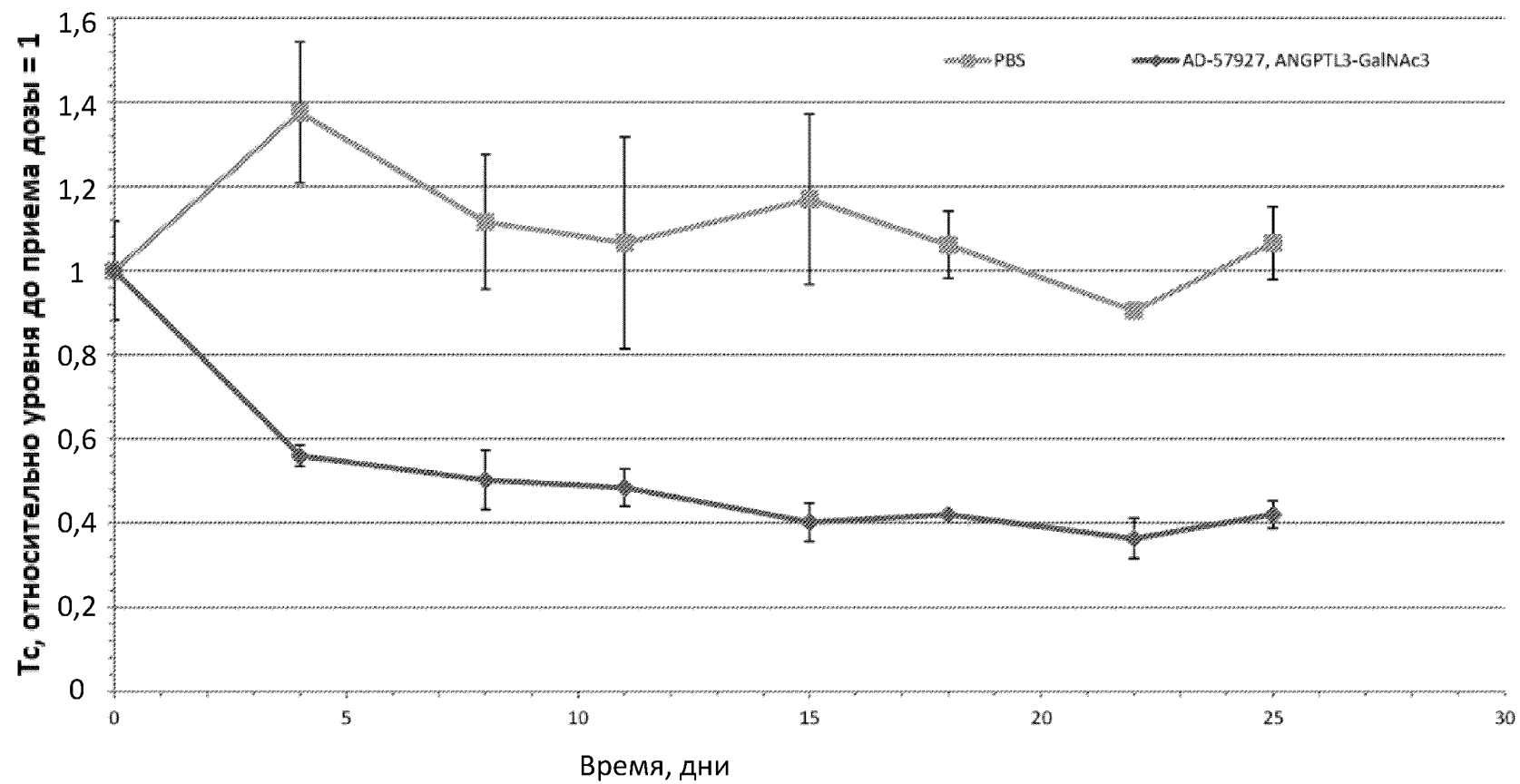
Фигура 2



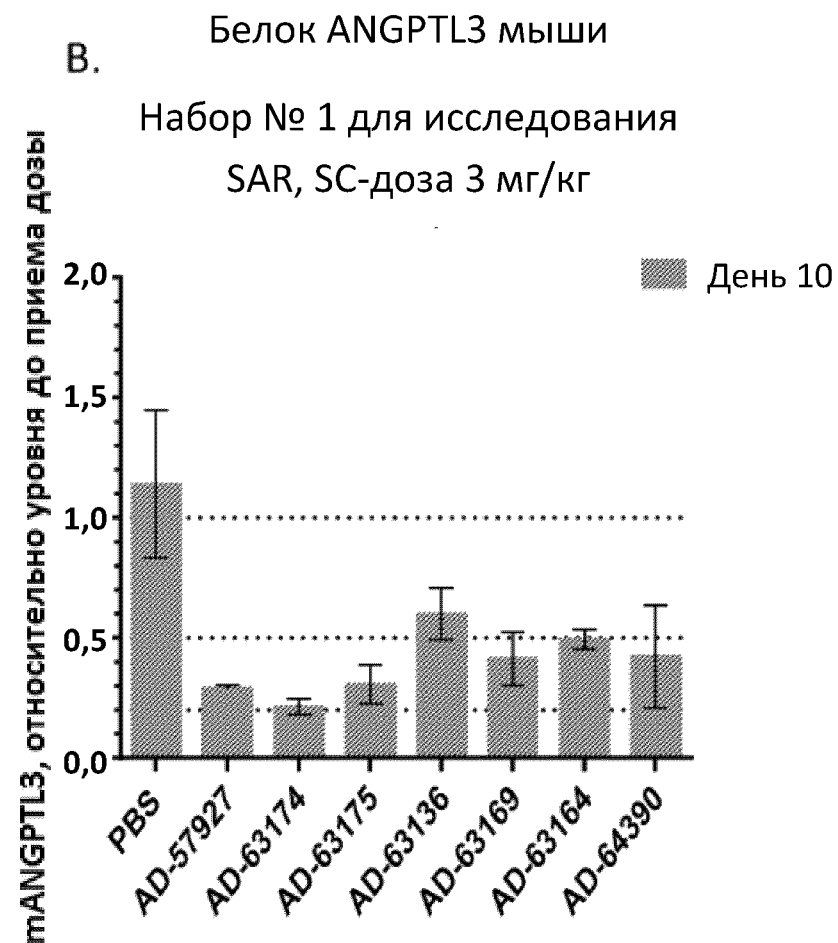
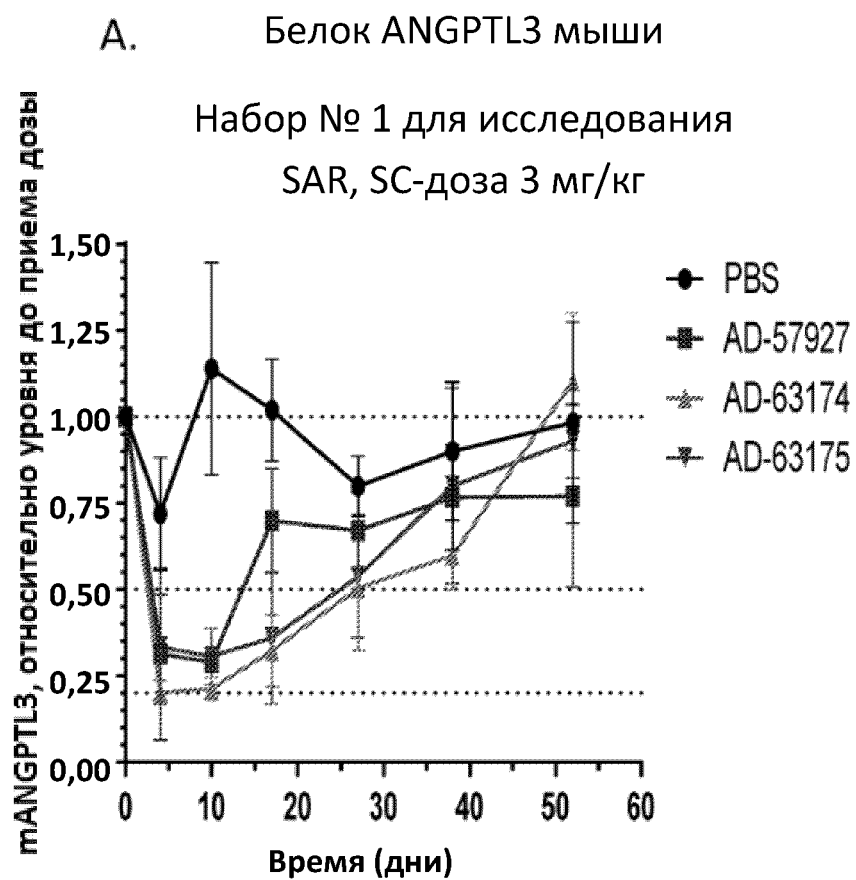
Фигура 3



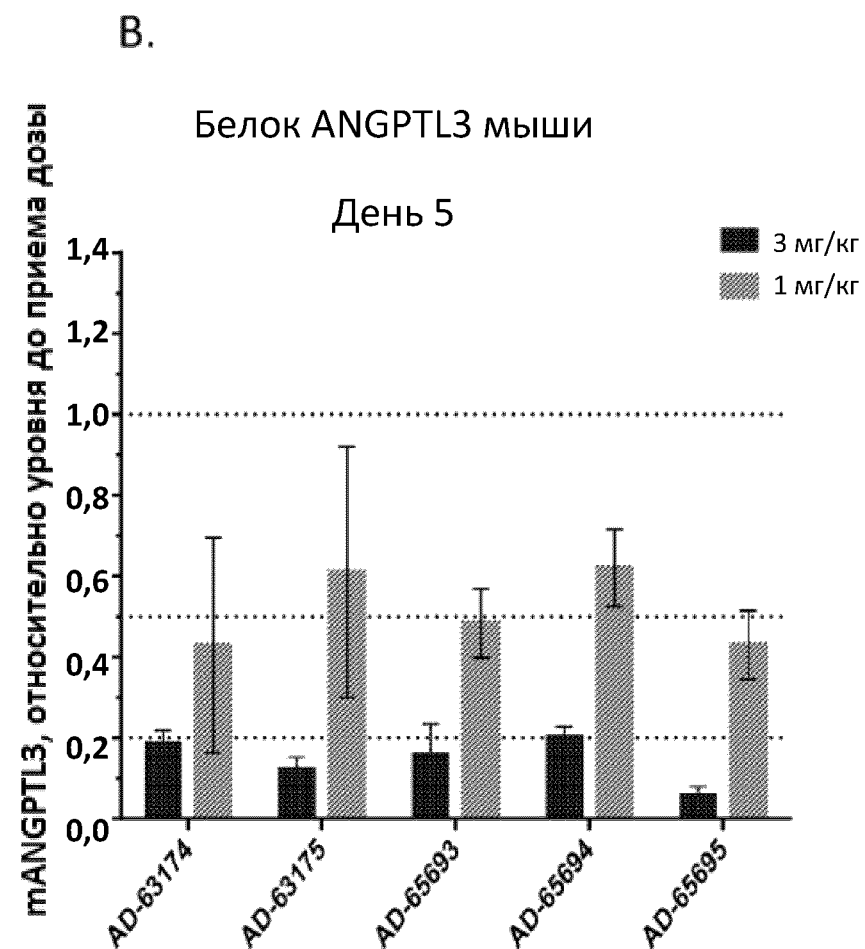
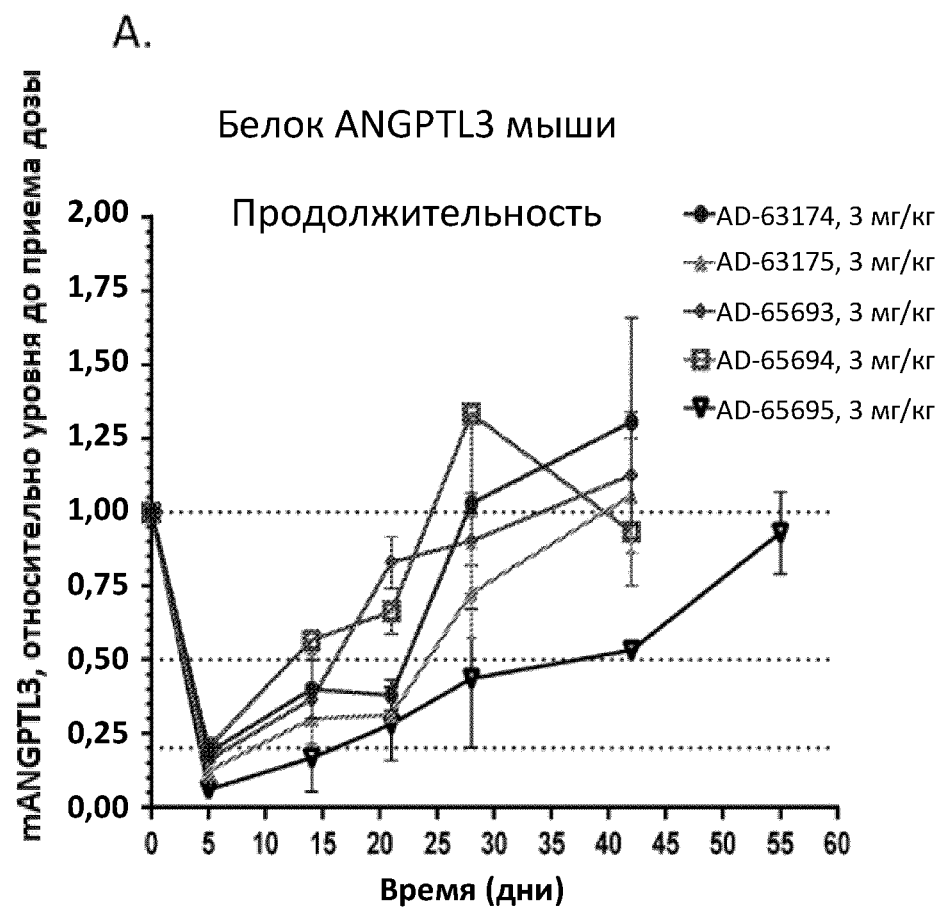
Фигура 4



Фигура 5

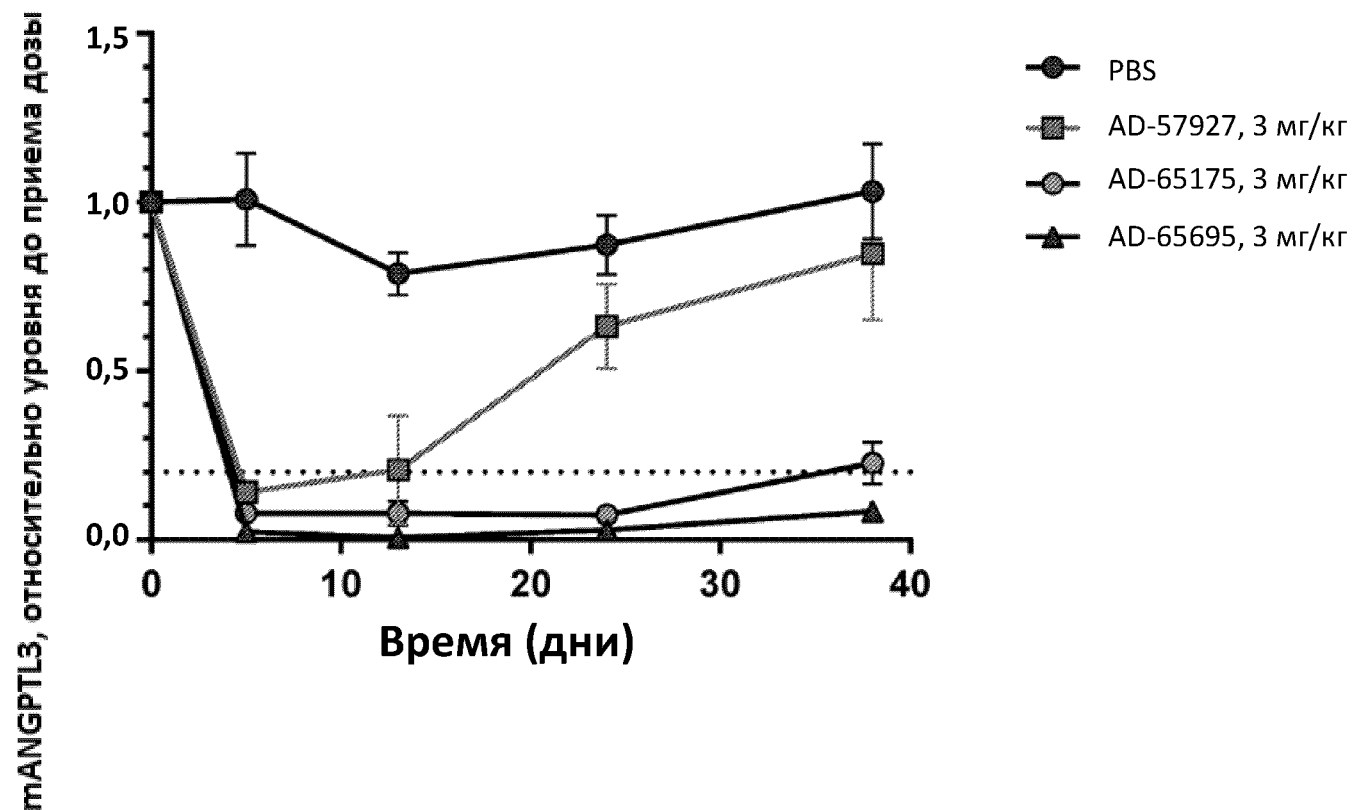


Фигура 6



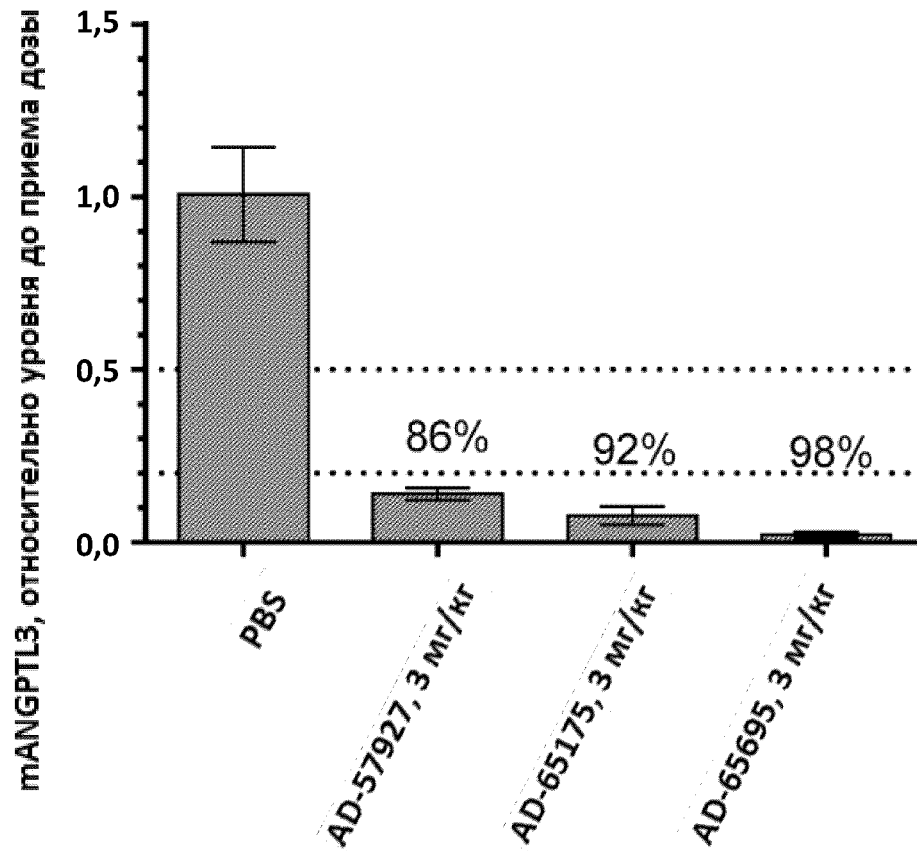
Фигура 7

ANGPTL3 мыши: лидерные молекулы в исследовании SAR по сравнению с исходными при 3 мг/кг у мышей ob/ob



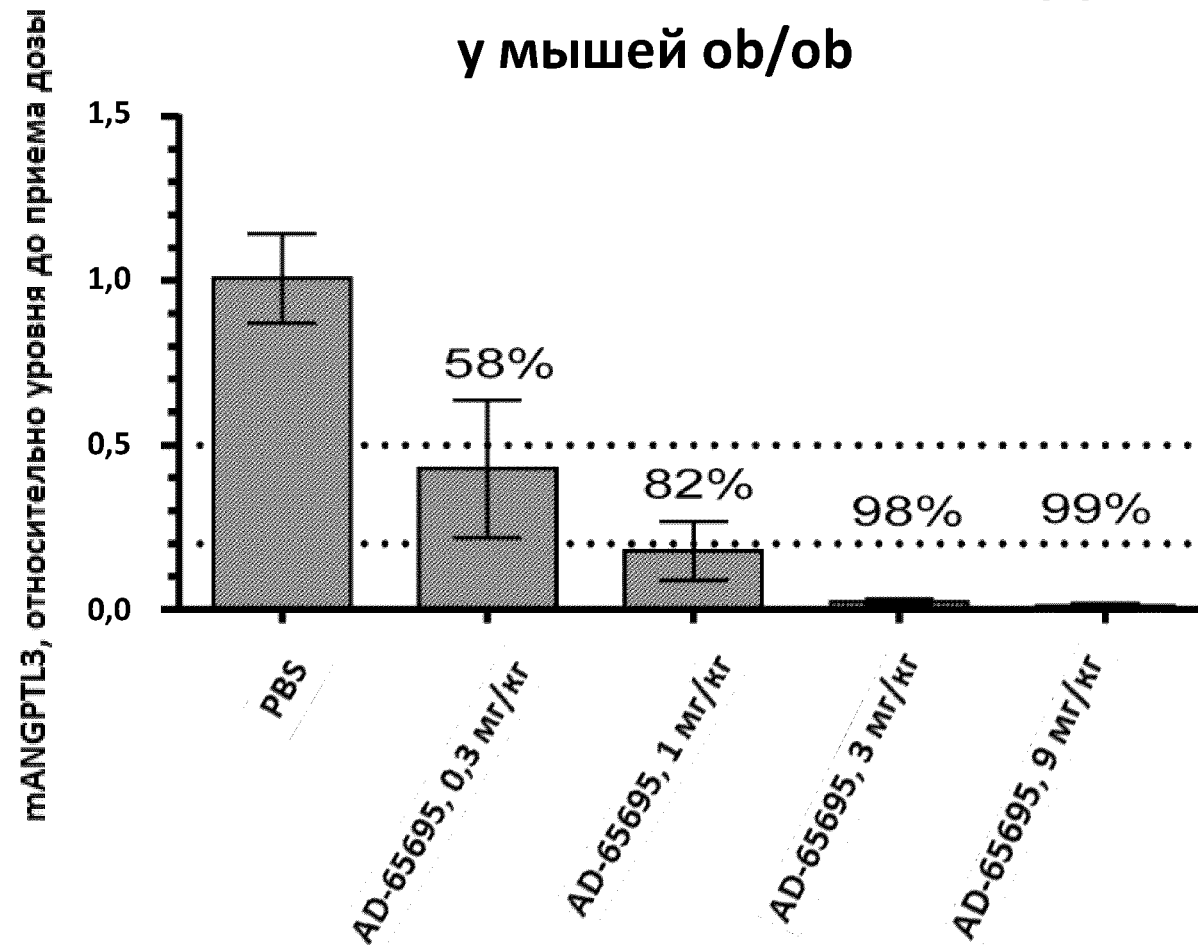
Фигура 8А

ANGPTL3 мыши: лидерные молекулы в исследовании SAR по сравнению с исходными при 3 мг/кг у мышей ob/ob

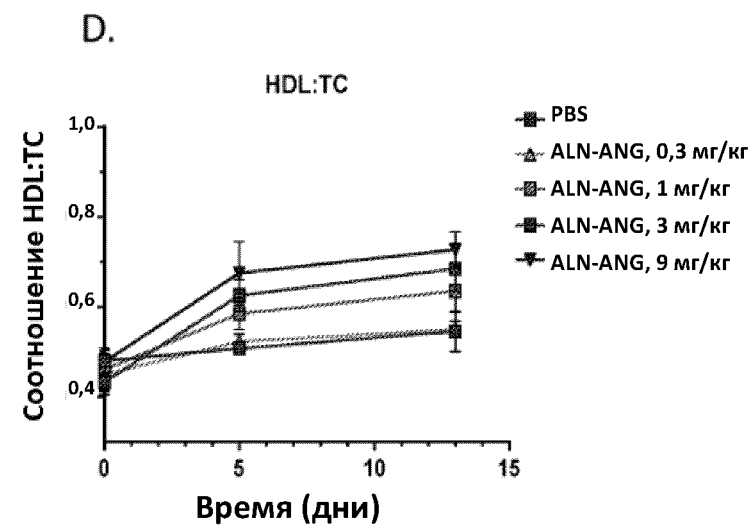
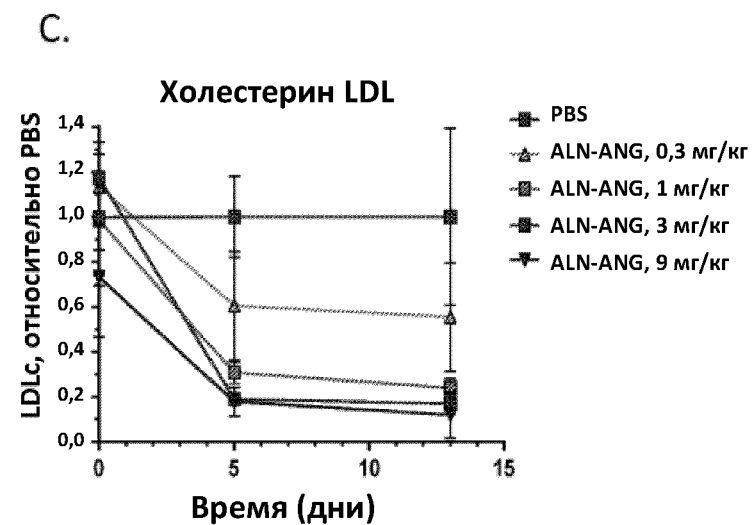
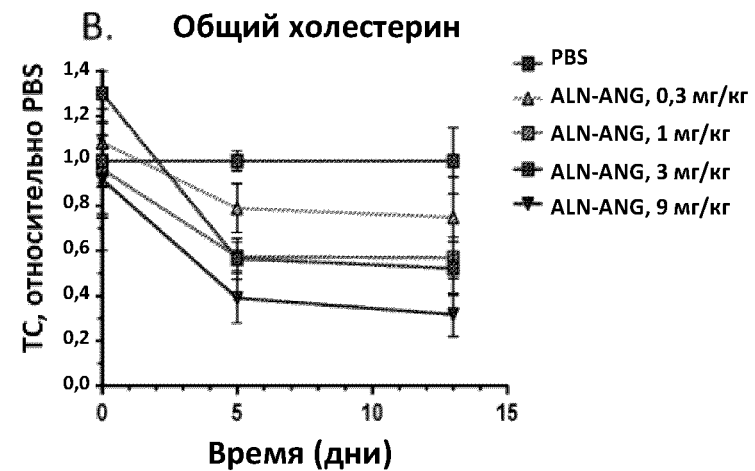
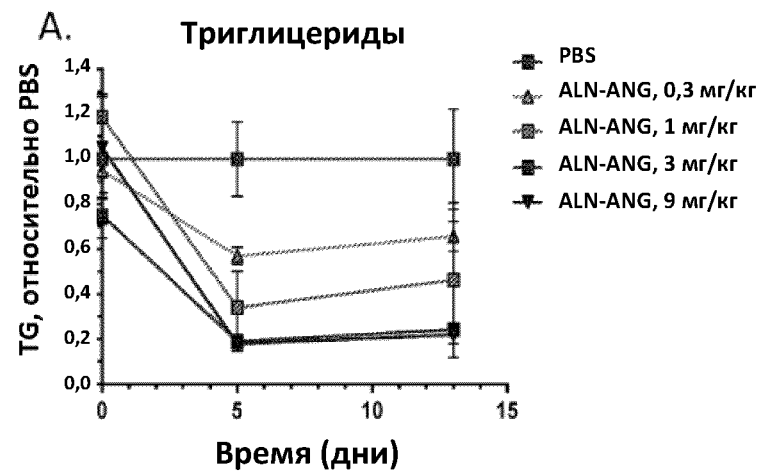


Фигура 8В

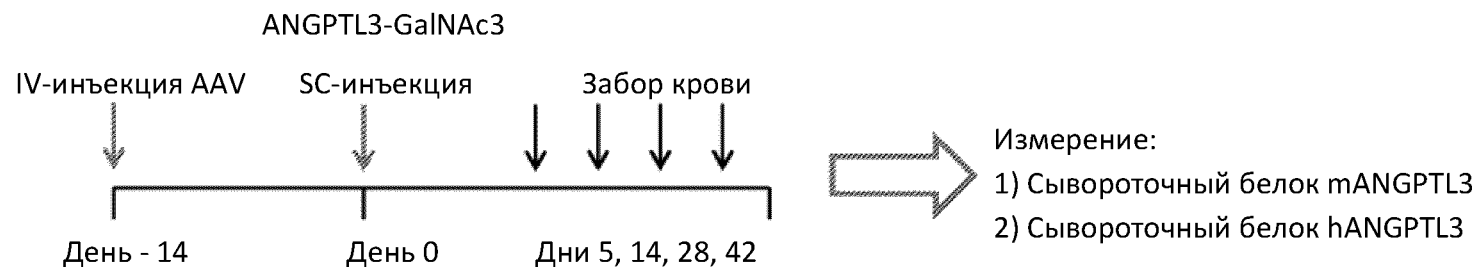
ANGPTL3-GalNAc, дозозависимый эффект у мышей ob/ob



Фигура 9



Фигура 10



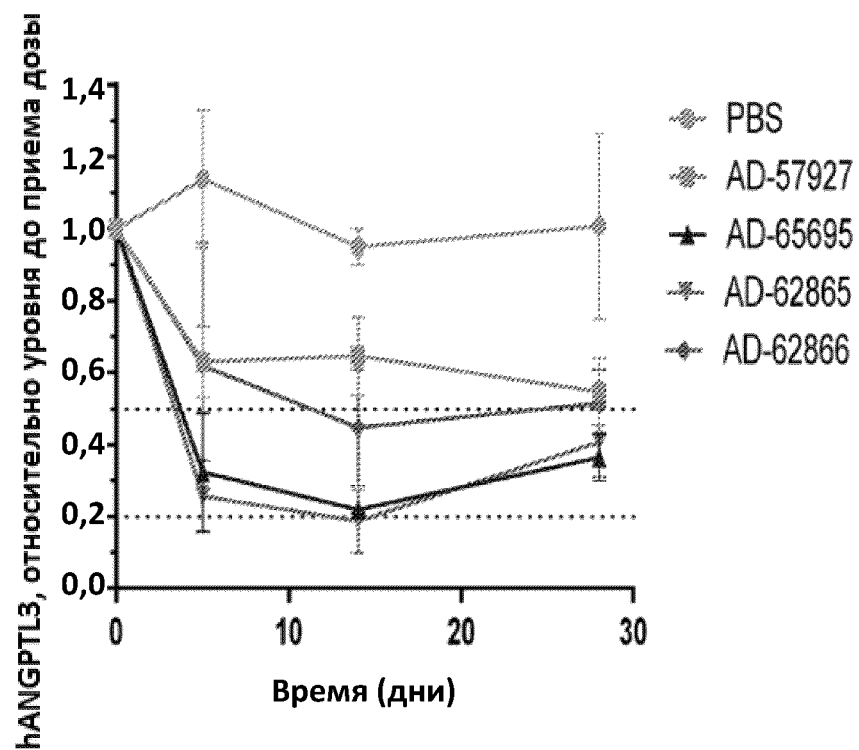
Вектор	Доза вектора (GC/мышь)	Перекрестная реактивность*	ANGPTL3-GalNAc3	Доза siRNA (мг/кг)	N=
AAV8-TBG-ANGPTL3	1,00 E+11	-	PBS	0	4
		m/r/cy/h	AD-57927, TOFFEE с 6 PS	3	4
		m/r/cy/h	AD-65695, 6 PS (вариант AD-57927 с низким показателем FI)	3	4
		cy/h	AD-62865, TOFFEE с 6 PS	3	4
		cy/h	AD-62866, TOFFEE с 6 PS	3	4

*m = мышь
r = крыса
cy = макак-крабод
h = человек

Фигура 11

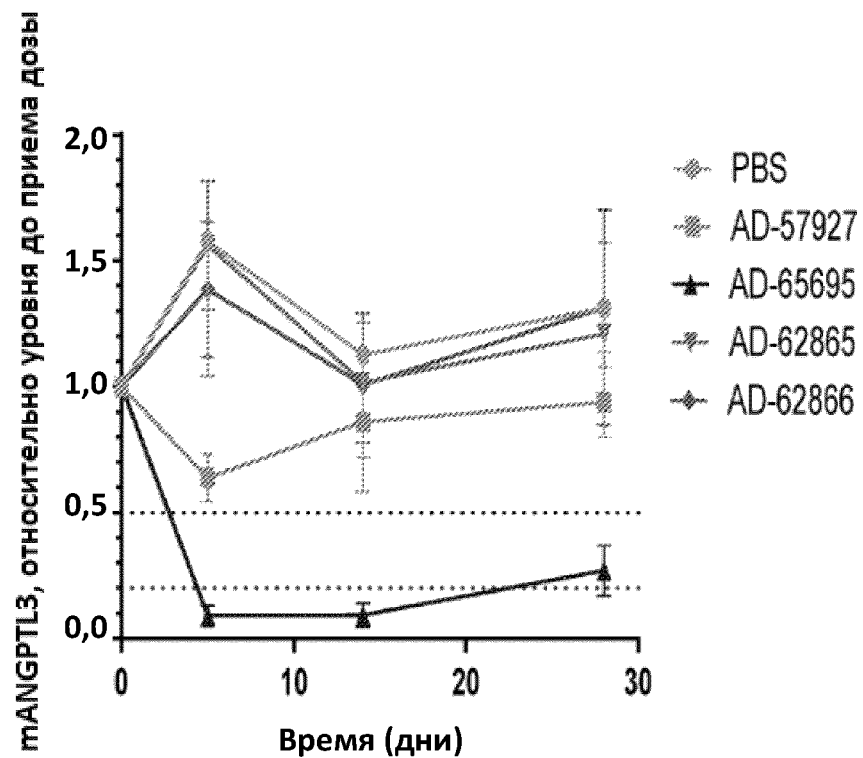
A.

Уровни белка ANGPTL3 человека
Относительно уровня до приема дозы

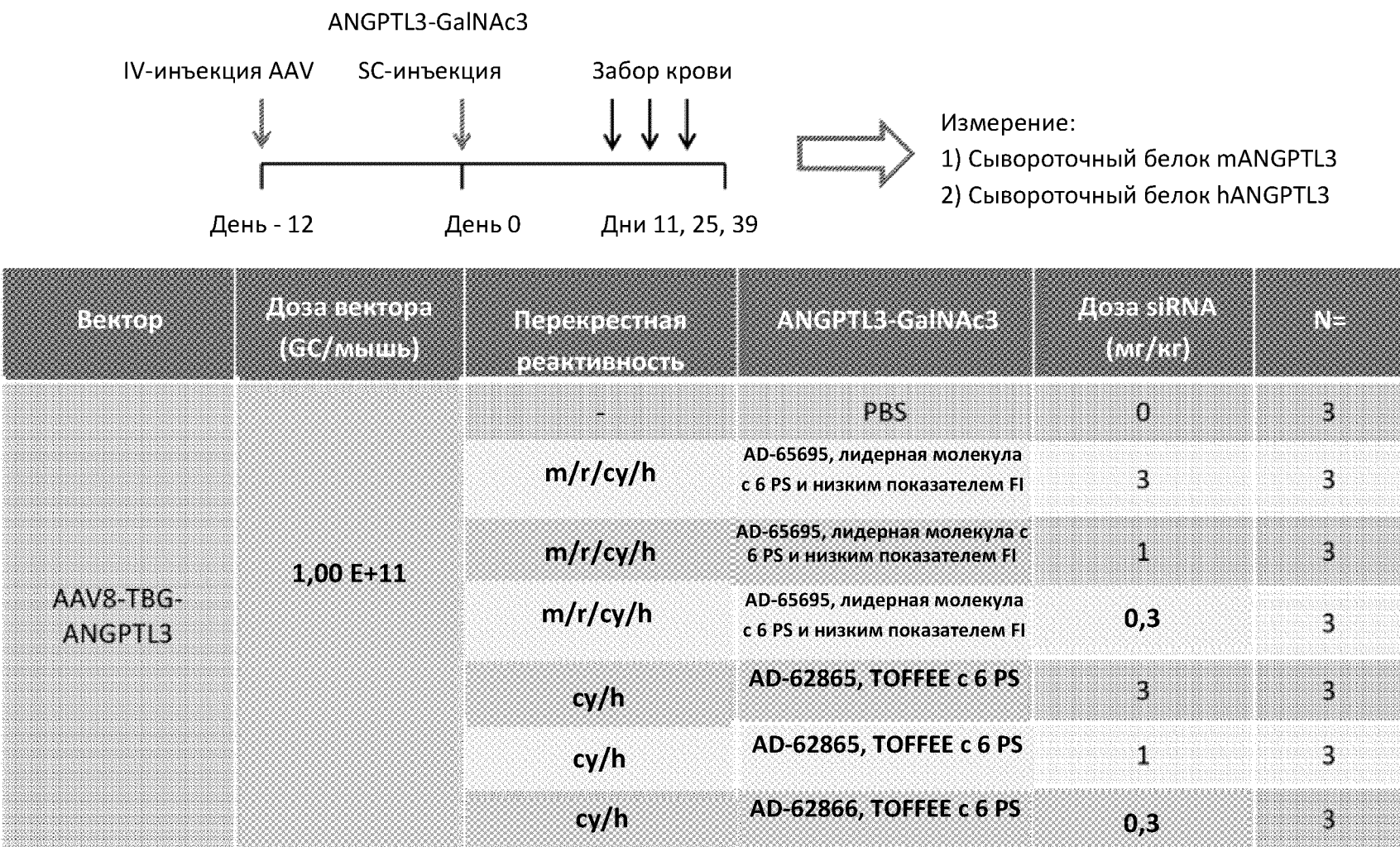


B.

Уровни белка ANGPTL3 мыши
Относительно уровня до приема дозы



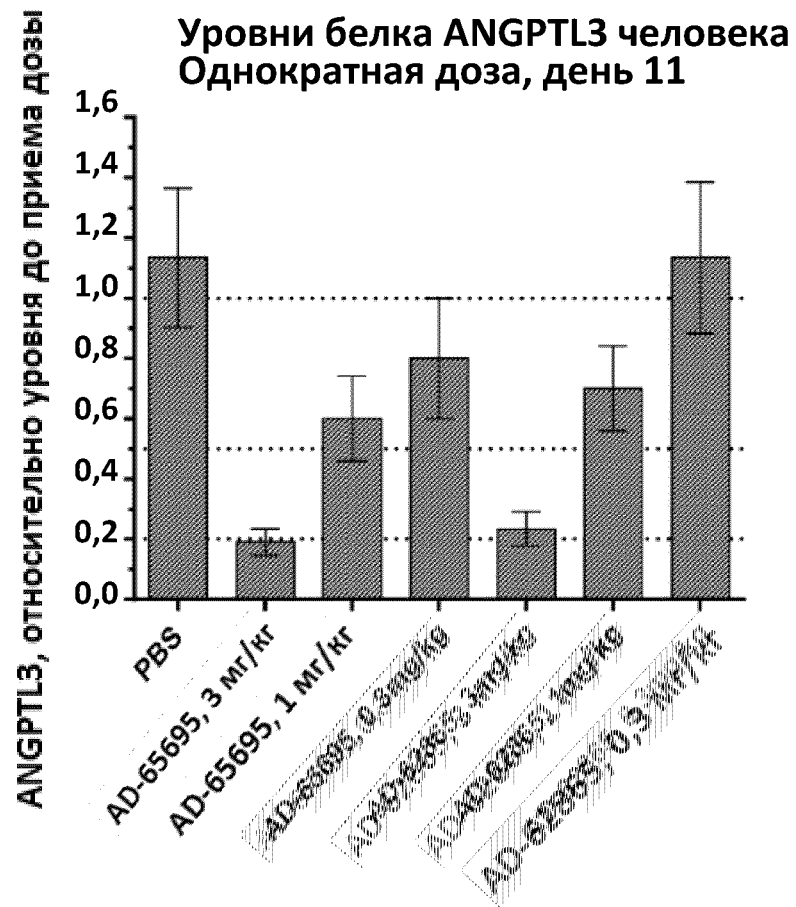
Фигура 12



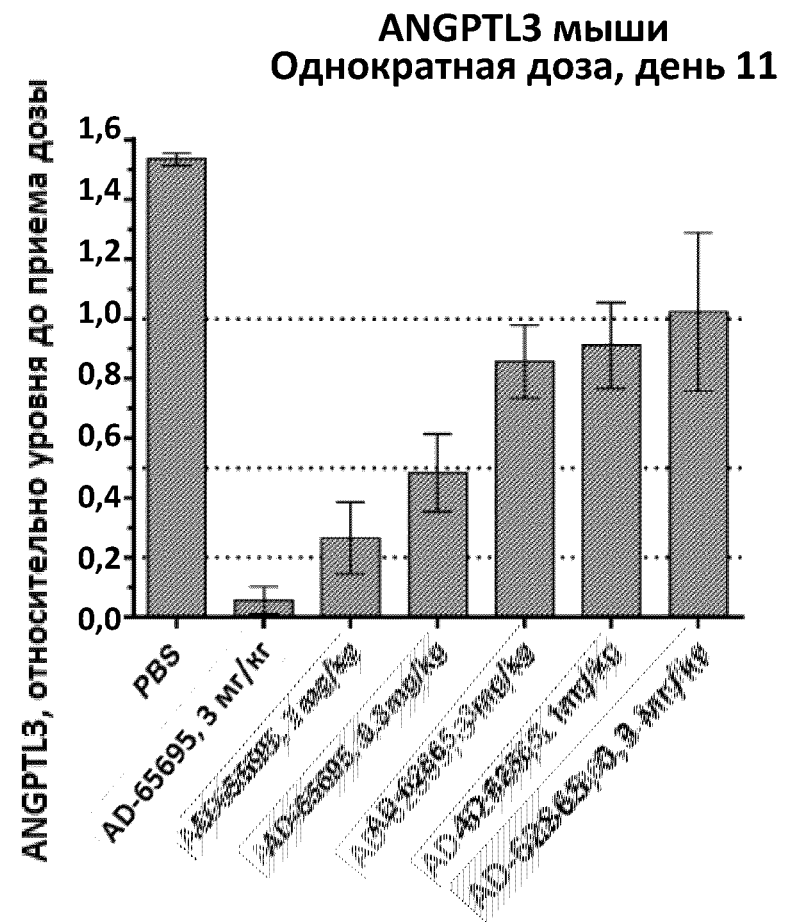
14/22

Фигура 13

A.



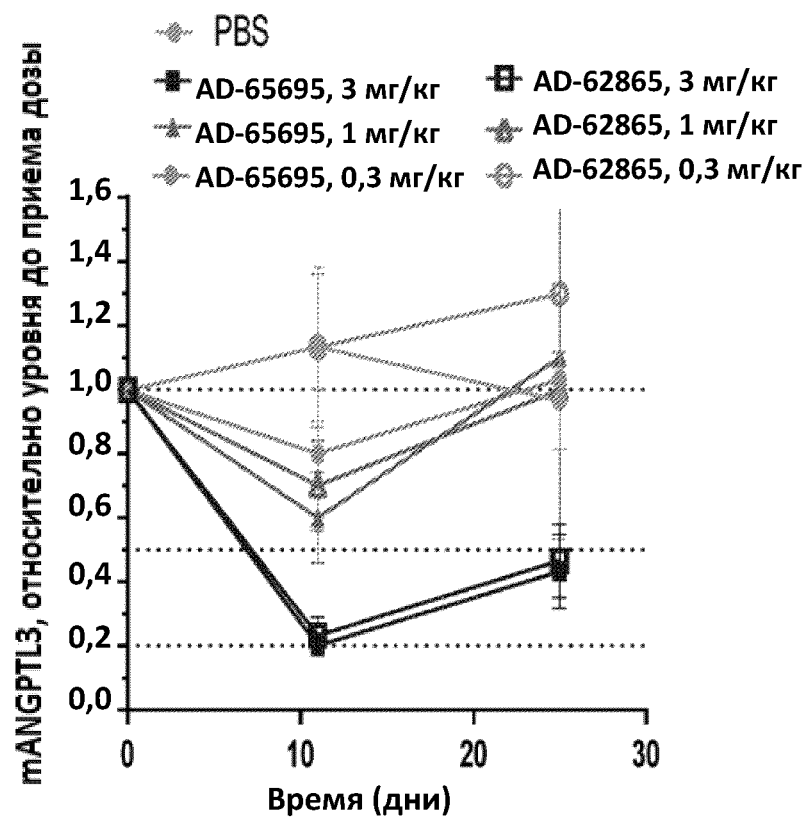
B.



Фигура 14

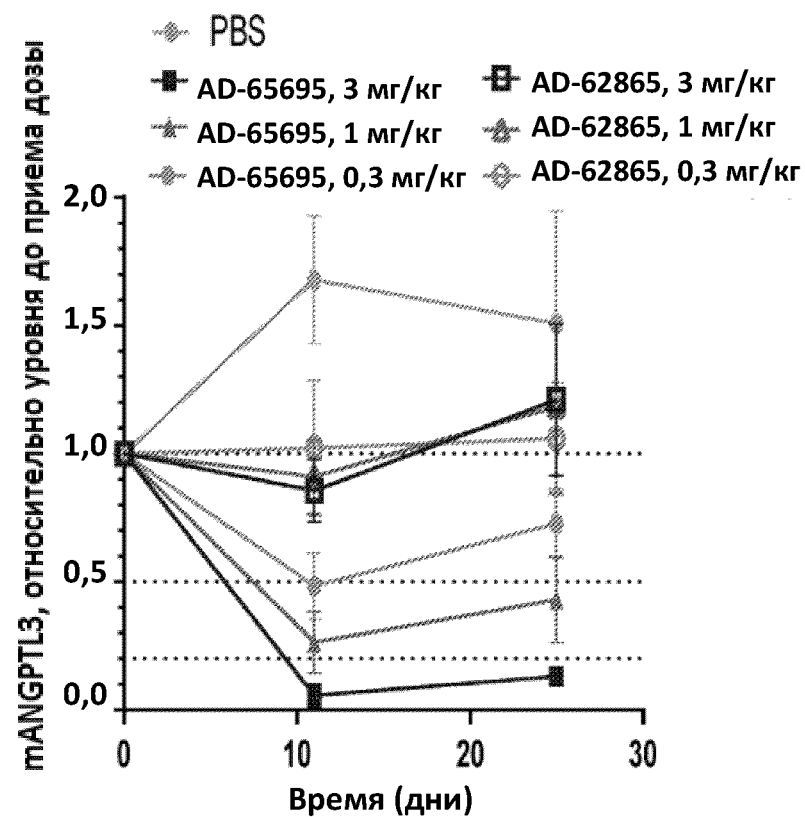
А.

Уровни белка ANGPTL3 человека

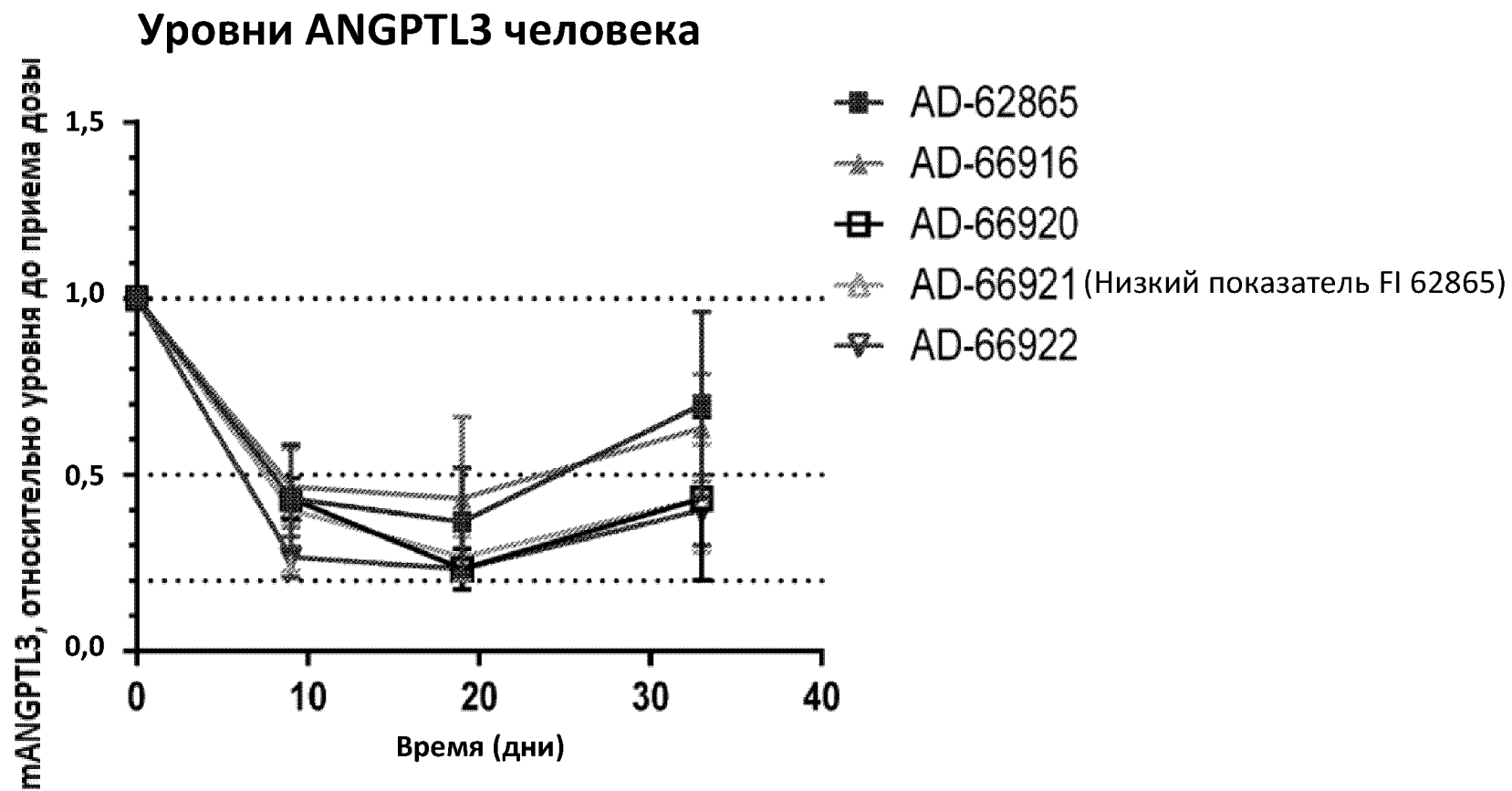


В.

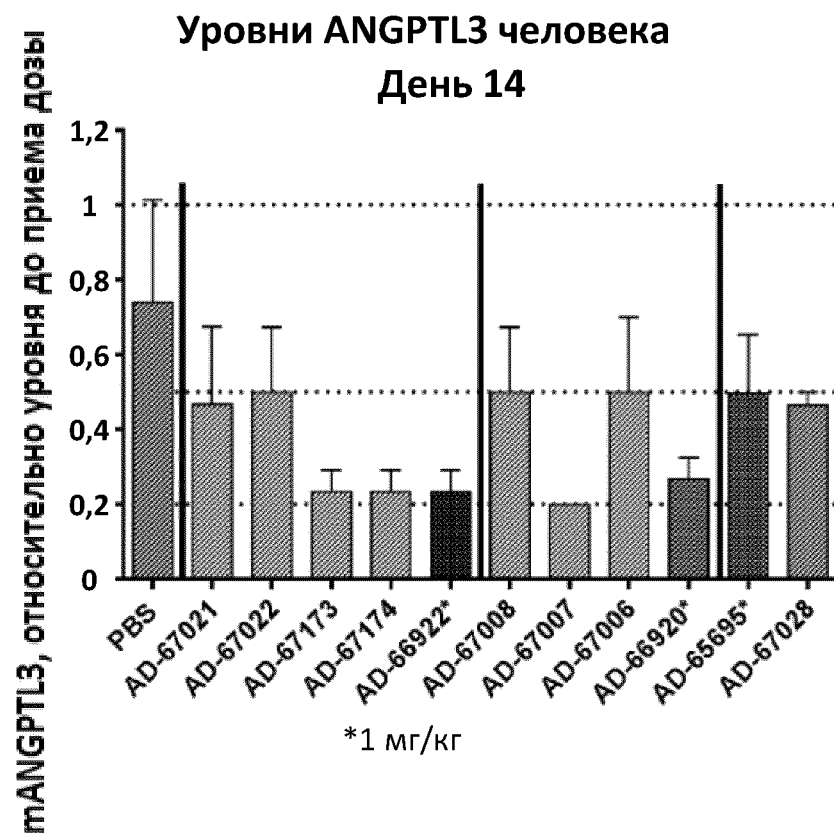
Уровни белка ANGPTL3 мыши



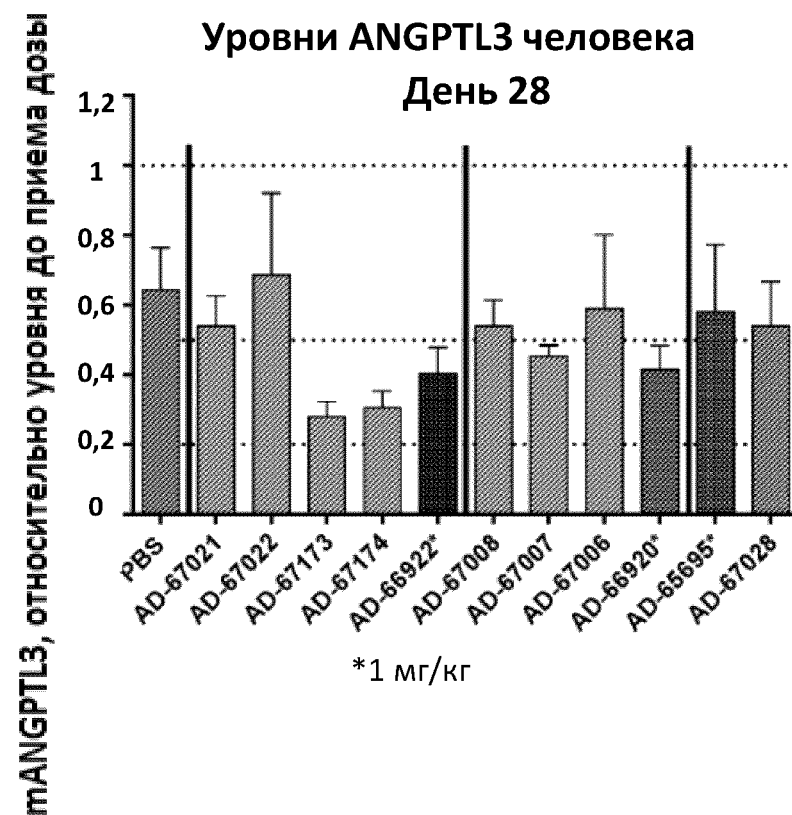
Фигура 15



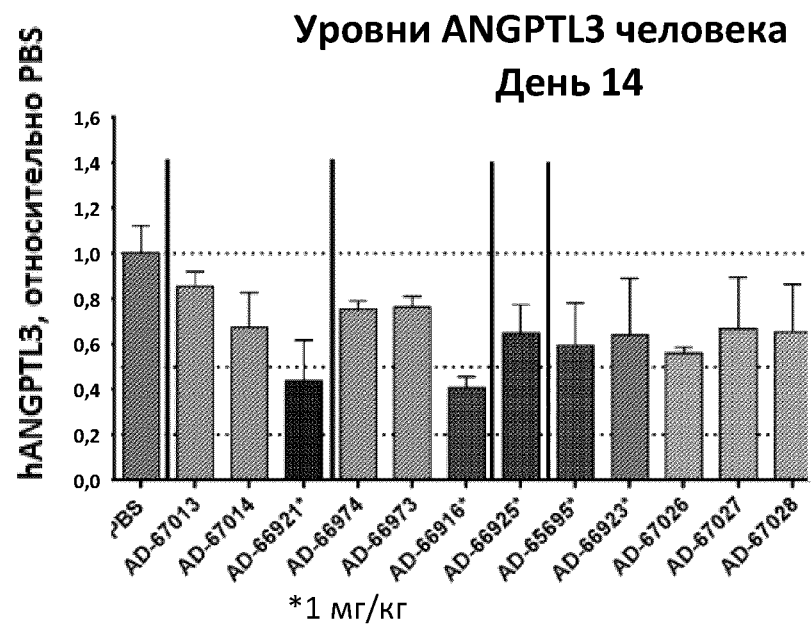
Фигура 16



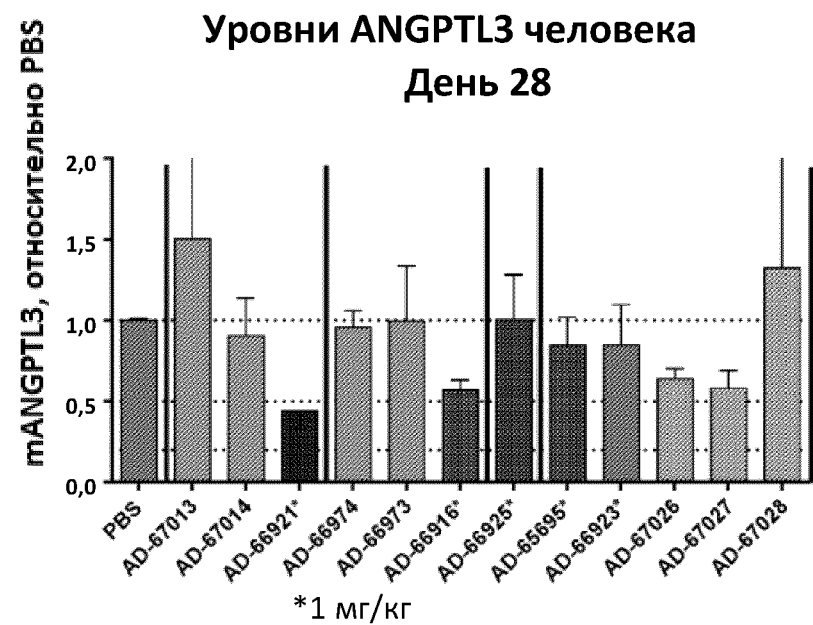
Фигура 17А



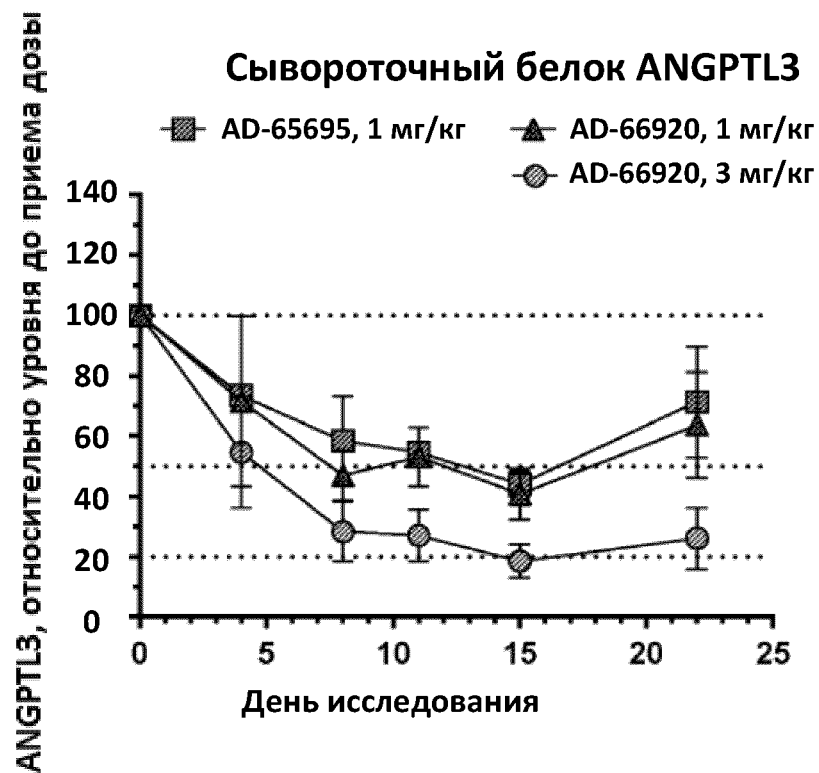
Фигура 17В



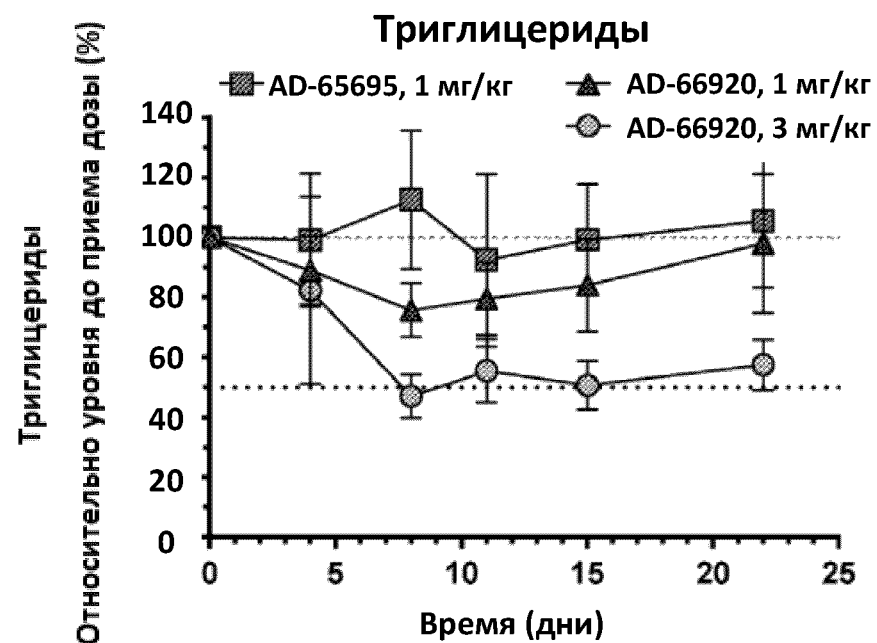
Фигура 18А



Фигура 18В



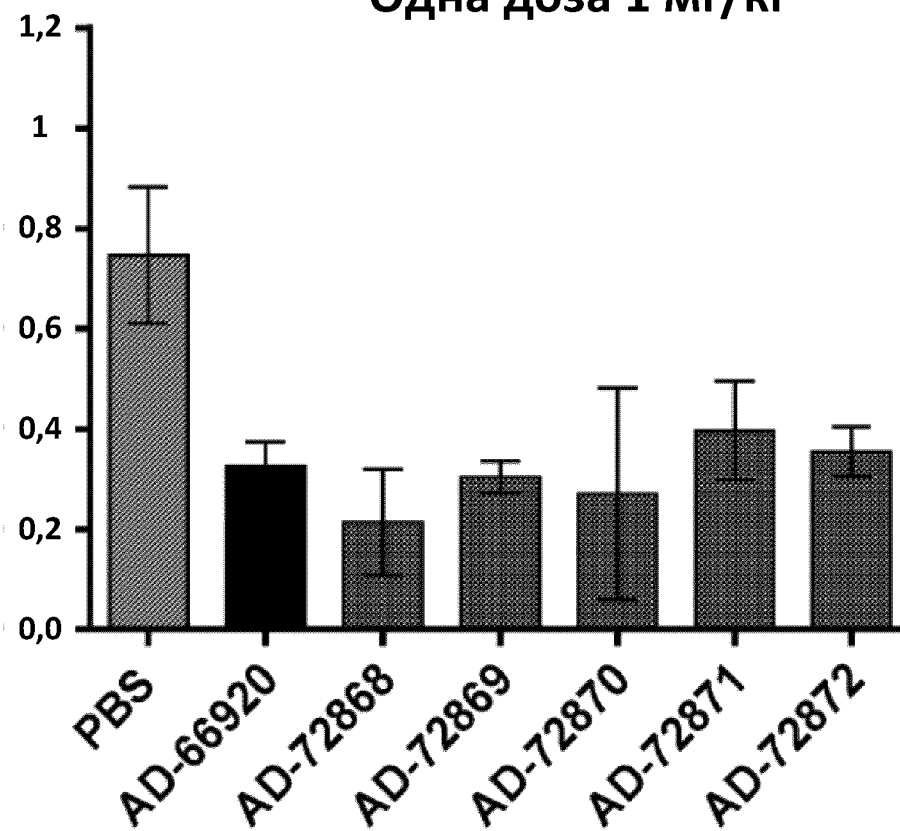
Фигура 19А



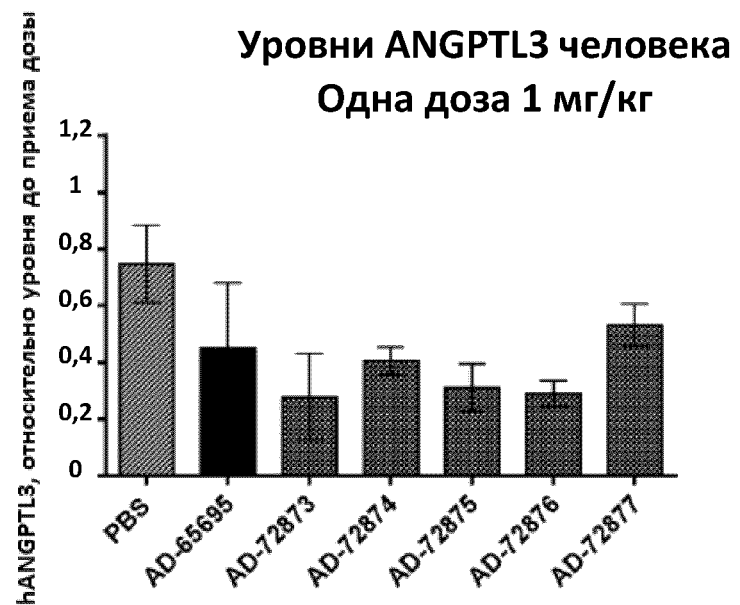
Фигура 19В

hANGPTL3, относительно уровня до приема дозы

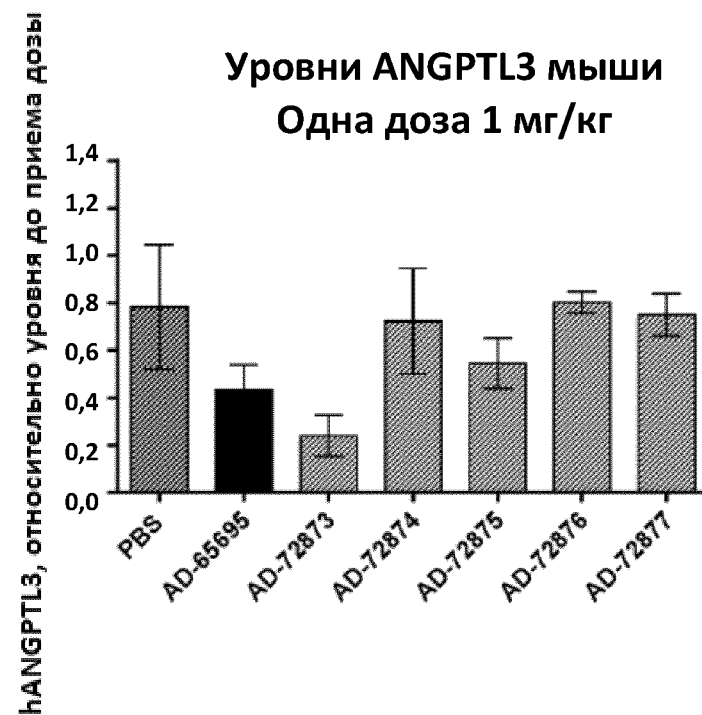
Уровни белка ANGPTL3 человека
Одна доза 1 мг/кг



Фигура 20



Фигура 21A



Фигура 21B

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202291496

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C12N 15/113, 15/63, 5/06, 5/071, A61K 31/713, 48/00, A61P 3/06, 9/10

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
C12N 15/113, 15/63, 5/06, 5/071, A61K 31/713, 48/00, A61P 3/06, 9/10

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	WO 2012/177784 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS) 27.12.2012,	1-19, 22-36
A	формула, с. 4, 149, 158, 211-214, примеры 1-4	20-21
A	WO 2012/177947 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC) 27.12.2012	1-36
A	WO 2011/085271 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS INC) 14.07.2011	1-36

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"Р" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

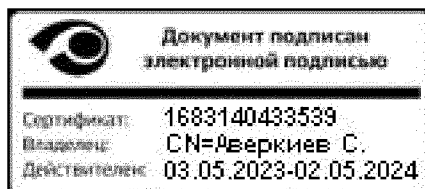
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 24 октября 2023 (24.10.2023)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202291496

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

МПК:

C12N 15/113(2010.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/071 (2006.01)
A61K 31/713(2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

СПК:

C12N 15/1136(2013-01)
C12N 15/63 (2013-01)
C12N 5/06 (2022-05)
A61K 31/713 (2013-01)
A61K 48/00 (2013-01)
A61P 3/06 (2018-01)
A61P 9/10 (2018-01)