

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202292383** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2023.04.14

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.03.18

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ ANGPTL3**

---

(31) 62/991,335

(72) Изобретатель:

(32) 2020.03.18

**Браун Боб Д., Дудек Хенрик Т.,**

(33) US

**Саксена Утсав, Абрамс Марк,**

(86) PCT/US2021/022967

**Туранов Антон (US)**

(87) WO 2021/188795 2021.09.23

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

**Нилова М.И. (RU)**

**ДИСЕРНА ФАРМАСЬЮТИКАЛС,  
ИНК. (US)**

---

(57) В настоящем изобретении предлагаются олигонуклеотиды, которые ингибируют экспрессию ангиопоэтинподобного белка 3 (ANGPTL3). Также предлагаются композиции, включающие их, и их применения, в частности применения, относящиеся к лечению заболеваний, нарушений и/или патологических состояний, ассоциированных с экспрессией ANGPTL3.

**202292383**

**A1**

**A1**

**202292383**

## КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ ANGPTL3

### ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[001] В настоящей заявке заявляется приоритет по 35 U.S.C. § 119(e) предварительной заявки на патент США № 62/991 335, поданной 18 марта 2020 г., содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[002] Настоящее изобретение относится к олигонуклеотидам, которые ингибируют экспрессию ангиопоэтиноподобного белка 3 (ANGPTL3), и их применениям, в частности, применениям, связанным с лечением заболеваний, нарушений и/или патологических состояний, связанных с экспрессией ANGPTL3.

### ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[003] Настоящая заявка подается совместно с перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей предоставлен в виде файла под названием 400930\_182359\_SL.txt, созданного 18 марта 2021 г., размером 371 КБ. Информация в электронном формате Перечня последовательностей включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[004] Нарушения метаболизма липидов могут привести к повышению уровня липидов в сыворотке крови, таких как триглицериды и/или холестерин. Повышенный уровень липидов в сыворотке тесно связан с высоким кровяным давлением, сердечно-сосудистыми заболеваниями, диабетом и другими патологическими состояниями. Несмотря на успехи в лечении, остается очень высокая неудовлетворенная клиническая потребность в лекарственных средствах для лечения сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний.

[005] Гипертриглицеридемия представляет собой нарушение липидного обмена, характеризующееся аномально повышенной концентрацией триглицеридов в крови (*например*, >150 мг/дл). Гипертриглицеридемия была ассоциирована с развитием сердечно-сосудистых заболеваний (*например*, атеросклероза). Тяжелая гипертриглицеридемия (*например*, >500 мг/дл) может вызвать панкреатит, эруптивные ксантомы или *липемию сетчатки*. В некоторых случаях чрезвычайно высокие уровни хиломикроннов могут вызывать синдром хиломикронемии, который характеризуется периодическими болями в животе, тошнотой, рвотой и панкреатитом (Pejic & Lee (2006) *J. Am. Board. Fam. Med.* 19:310-316). Гиперлипидемия представляет собой еще одно нарушение липидного обмена, характеризующееся повышенным уровнем любого одного или всех липидов и/или липопротеинов в крови.

[006] ANGPTL3 является представителем ангиопоэтиноподобного семейства секретируемых белков, которые регулируют метаболизм липидов и преимущественно экспрессируются в печени (Koishi *et al.* (2002) *Nat. Genet.* 30:151-157). ANGPTL3 ингибирует липопротеинлипазу (LPL), которая катализирует гидролиз триглицеридов, и ингибирует эндотелиальную липазу (EL), которая гидролизует фосфолипиды липопротеинов высокой плотности (HDL).

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[007] Аспекты настоящего изобретения относятся к композициям и способам лечения заболевания, нарушения и/или патологического состояния, связанного с экспрессией ANGPTL3. Настоящее изобретение

частично основано на открытии и разработке олигонуклеотидов, которые избирательно ингибируют и/или снижают экспрессию ANGPTL3.

[008] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается олигонуклеотид для снижения экспрессии ANGPTL3, при этом олигонуклеотид содержит антисмысловую цепь, содержащую последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114 и 116.

[009] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается олигонуклеотид для снижения экспрессии ANGPTL3, при этом олигонуклеотид содержит смысловую цепь, содержащую последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113 и 115.

[0010] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для снижения экспрессии ANGPTL3 содержит антисмысловую цепь длиной от 15 до 30 нуклеотидов и смысловую цепь длиной от 15 до 40 нуклеотидов, при этом антисмысловая цепь имеет область комплементарности целевой последовательности ANGPTL3, как указано в любой из SEQ ID NO: 125, 126, 127, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124 и 117, и при этом область комплементарности составляет по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в длину.

[0011] В некоторых вариантах осуществления длина антисмысловой цепи составляет от 19 до 27 нуклеотидов или от 21 до 27 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина антисмысловой цепи составляет 22 нуклеотида.

[0012] В некоторых вариантах осуществления длина смысловой цепи составляет от 19 до 40 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина смысловой цепи составляет 36 нуклеотидов.

[0013] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для снижения экспрессии ANGPTL3 имеет дуплексную область длиной по меньшей мере 19 нуклеотидов или длиной по меньшей мере 21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления дуплексная область имеет длину 20 нуклеотидов.

[0014] В некоторых вариантах осуществления область комплементарности ANGPTL3 имеет длину по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов или по меньшей мере 21 последовательный нуклеотид.

[0015] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для снижения экспрессии ANGPTL3 содержит на смысловой цепи на ее 3'-конце структуру «стебель-петля», указанную как: S1-L-S2, при этом S1 комплементарен S2, и при этом L образует петлю между S1 и S2 длиной от 3 до 5 нуклеотидов.

[0016] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для снижения экспрессии ANGPTL3 содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, при этом длина антисмысловой цепи составляет от 21 до 27 нуклеотидов и она имеет область, комплементарную ANGPTL3, при этом смысловая цепь содержит на своем 3'-конце структуру «стебель-петля», указанную как: S1-L-S2, при этом S1 комплементарен S2, и при этом L образует петлю между S1 и S2 длиной от 3 до 5 нуклеотидов, и при этом антисмысловая цепь и смысловая цепь образуют дуплексную структуру. длиной по меньшей мере 19 нуклеотидов, но не связаны ковалентно.

[0017] В некоторых вариантах осуществления петля L представляет собой тетрапетлю. В некоторых вариантах осуществления L имеет длину 4 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления L содержит последовательность GAAA.

[0018] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для снижения экспрессии ANGPTL3 содержит антисмысловую цепь длиной 27 нуклеотидов и смысловую цепь длиной 25 нуклеотидов. В

некоторых вариантах осуществления указанный олигонуклеотид содержит антисмысловую цепь длиной 22 нуклеотида и смысловую цепь длиной 36 нуклеотидов.

[0019] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид с дуплексной областью содержит 3'-липкую последовательность на антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления 3'-липкая последовательность на антисмысловой цепи имеет длину 2 нуклеотида.

[0020] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для снижения экспрессии ANGTP3 содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, каждая из которых имеет длину в диапазоне от 21 до 23 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления указанный олигонуклеотид содержит дуплексную структуру длиной от 19 до 21 нуклеотида. В некоторых таких вариантах осуществления олигонуклеотид содержит 3'-липкую последовательность длиной в один или большее количество нуклеотидов, при этом 3'-липкая последовательность присутствует на антисмысловой цепи, смысловой цепи или антисмысловой цепи и смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления 3'-липкая последовательность имеет длину 2 нуклеотида, при этом 3'-липкая последовательность находится на антисмысловой цепи, и при этом смысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид, а антисмысловая цепь имеет длину 23 нуклеотида, так что смысловая цепь и антисмысловая цепь образуют дуплекс длиной 21 нуклеотид.

[0021] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для снижения экспрессии ANGTP3 содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид содержит 2'-модификацию. В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды олигонуклеотида модифицированы, например, посредством 2'-модификации.

[0022] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для снижения экспрессии ANGPTL3 содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеотидную связь, предпочтительно тиофосфатную связь.

[0023] В некоторых вариантах осуществления 4'-углерод сахара 5'-нуклеотида антисмысловой цепи содержит аналог фосфата, например, оксиметилфосфонат, винилфосфонат или малонилфосфонат.

[0024] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один нуклеотид олигонуклеотида конъюгирован с одним или большим количеством нацеливающихся лигандов, таких как углевод, аминсахар, холестерин, полипептид или липид. В некоторых вариантах осуществления нацеливающийся лиганд содержит фрагмент N-ацетилгалактозамина (GalNAc). В некоторых вариантах осуществления фрагмент GalNAc содержит моновалентный фрагмент GalNAc, двухвалентный фрагмент GalNAc, трехвалентный фрагмент GalNAc или четырехвалентный фрагмент GalNAc.

[0025] В некоторых вариантах осуществления нацеливающийся лиганд конъюгирован с одним или большим количеством нуклеотидов L структуры «стебель-петля». В некоторых вариантах осуществления каждый из 4 нуклеотидов L структуры «стебель-петля» конъюгирован с моновалентным фрагментом GalNAc.

[0026] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для снижения экспрессии ANGPTL3 представляет собой олигонуклеотид РНКi.

[0027] В другом аспекте настоящего изобретения предлагается способ снижения экспрессии ANGPTL3 в клетке, популяции клеток или в организме субъекта путем введения олигонуклеотида по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способ снижения экспрессии ANGPTL3 в клетке, популяции клеток или в организме субъекта включает этап приведения в контакт с клеткой или популяцией клеток или введение субъекту эффективного количества олигонуклеотида по настоящему изобретению или его фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления способ снижения экспрессии

ANGPTL3 включает снижение количества или уровня мРНК ANGPTL3, количества или уровня белка ANGPTL3 или того и другого.

[0028] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ снижения количества или уровня триглицеридов (TG) у субъекта путем введения субъекту эффективного количества олигонуклеотида по настоящему изобретению или его фармацевтической композиции.

[0029] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ снижения количества или уровня холестерина у субъекта путем введения указанному субъекту эффективного количества олигонуклеотида по настоящему изобретению или его фармацевтической композиции.

[0030] В некоторых вариантах осуществления субъект, который получает лечение олигонуклеотидом по настоящему изобретению, имеет заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления способ лечения субъекта, имеющего заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества олигонуклеотида по настоящему изобретению или его фармацевтической композиции, тем самым осуществляя лечение указанного субъекта.

[0031] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вводят олигонуклеотид, который содержит смысловую цепь длиной от 15 до 50 нуклеотидов и антисмысловую цепь длиной от 15 до 30 нуклеотидов, при этом смысловая цепь образует дуплексную область с антисмысловой цепью, и при этом смысловая цепь содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113 и 115, и при этом антисмысловая цепь содержит комплементарную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114 и 116, или его фармацевтическую композицию, тем самым осуществляя лечение указанного субъекта.

[0032] В некоторых вариантах осуществления способ лечения субъекта, имеющего заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества олигонуклеотида, содержащего пару смысловой и антисмысловой цепей, выбранных из строки таблицы, указанной в Таблице 5, или его фармацевтической композиции, тем самым осуществляя лечение указанного субъекта.

[0033] В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, выбирают из группы, состоящей из гипертриглицеридемии, ожирения, гиперлипидемии, нарушенного метаболизма липидов и/или холестерина, атеросклероза, сахарного диабета II типа, сердечно-сосудистых заболеваний, заболеваний коронарных артерий, неалкогольного стеатогепатита (NASH), неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), гомозиготной и гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии и статинорезистентной гиперхолестеринемии.

[0034] В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, представляет собой сердечно-сосудистое заболевание, сахарный диабет II типа, гипертриглицеридемию, NASH, ожирение или их комбинацию.

[0035] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид или его фармацевтическую композицию вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом или его композицией.

[0036] В еще одном аспекте настоящего изобретения предлагается применение любого из олигонуклеотидов по настоящему изобретению или их фармацевтической композиции в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания, нарушения или патологического состояния, ассоциированного с экспрессией ANGPTL3.

[0037] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению предназначены для применения или могут быть адаптированы для применения при лечении заболевания, нарушения или патологического состояния, ассоциированного с экспрессией ANGPTL3.

[0038] В еще одном аспекте олигонуклеотид по настоящему изобретению предлагается в виде набора для лечения заболевания, нарушения или патологического состояния, ассоциированного с экспрессией ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления указанный набор содержит олигонуклеотид по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления указанный набор дополнительно включает листок-вкладыш, содержащий инструкции по введению субъекту, страдающему заболеванием, нарушением или патологическим состоянием, ассоциированным с экспрессией ANGPTL3.

[0039] В некоторых вариантах осуществления применения или наборов, заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, выбирают из группы, состоящей из гипертриглицеридемии, ожирения, гиперлипидемии, нарушенного метаболизма липидов и/или холестерина, атеросклероза, сахарного диабета II типа, сердечно-сосудистых заболеваний, заболеваний коронарных артерий, NASH, NAFLD, гомозиготной и гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии и статинорезистентной гиперхолестеринемии.

[0040] В некоторых вариантах осуществления применения или наборов, заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, представляет собой сердечно-сосудистое заболевание, сахарный диабет II типа, гипертриглицеридемию, NASH, ожирение или их комбинацию.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0041] На Фиг. 1 представлен график, изображающий процент (%) мРНК ANGPTL3 в клетках NuH-7, трансфицированных указанными DsiPHK, по отношению к % мРНК ANGPTL3 контрольных имитационно обработанных клеток.

[0042] На Фиг. 2 представлен график, изображающий процент (%) мРНК ANGPTL3 в клетках NuH-7, трансфицированных указанными DsiPHK, по отношению к % мРНК ANGPTL3 контрольных имитационно обработанных клеток.

[0043] На Фиг. 3 представлена схема, демонстрирующая структуру и профили химической модификации генерических GalNAc-конъюгированных олигонуклеотидов ANGPTL3.

[0044] На Фиг. 4 представлен график, изображающий процент (%) мРНК ANGPTL3 в образцах печени мышей, получавших указанные GalNAc-конъюгированные олигонуклеотиды ANGPTL3, по сравнению с мышами, получавшими фосфатно-солевой буфер (PBS).

[0045] На Фиг. 5A-5C представлены графики, изображающие процент (%) мРНК ANGPTL3 в образцах печени приматов, не относящихся к человеку (NHP), получавших указанные GalNAc-конъюгированные олигонуклеотиды ANGPTL3, по сравнению с NHP, получавшими PBS, на день 28 (Фиг. 5A), день 56 (Фиг. 5B) и день 84 (Фиг. 5C) после лечения.

[0046] На Фиг. 6 представлен график, изображающий средний процент (%) мРНК ANGPTL3 в образцах печени NHP, получавших указанные GalNAc-конъюгированные олигонуклеотиды ANGPTL3, по сравнению с NHP, получавшими PBS, в динамике.

[0047] На Фиг. 7 представлен график, изображающий средний процент (%) белка ANGPTL3 в сыворотке NHP, получавших указанные GalNAc-конъюгированные олигонуклеотиды ANGPTL3, по сравнению с NHP, получавшими PBS, в динамике.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0048] I. Определения

[0049] В контексте данного документа термин «около» применительно к одному или большему количеству значений, представляющих интерес, относится к значению, которое аналогично указанному эталонному значению. В определенных вариантах осуществления термин «около» относится к диапазону значений, которые попадают в пределы 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % или менее в любую сторону (больше или меньше) от установленного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышало бы 100 % от возможного значения).

[0050] В контексте данного документа термины «введение», «применение» или «прием» означают предоставление субстанции (*например*, олигонуклеотида) субъекту фармакологически пригодным способом (*например*, для лечения патологического состояния у субъекта).

[0051] В контексте данного документа термин «ANGPTL3» относится к ангиопоэтиноподобному белку 3, который является представителем семейства ангиопоэтиноподобных секретируемых полипептидов. ANGPTL3 экспрессируется преимущественно в печени млекопитающих, и белок ANGPTL3 имеет характерную структуру ангиопоэтинов, включая сигнальный пептид, N-концевой спирально-спиральный домен и C-концевой фибриногеноподобный (FBN) домен. Для целей настоящего описания «ANGPTL3» относится к ANGPTL3 любого позвоночного или млекопитающего, включая, помимо прочего, человека, мышшь, примата, обезьяну, крупный рогатый скот, курицу, грызуна, крысу, свинью, овцу и морскую свинку. ANGPTL3 также относится к фрагментам и вариантам нативного ANGPTL3, которые сохраняют по меньшей мере одну активность нативного ANGPTL3 *in vivo* или *in vitro*. ANGPTL3 включает полноразмерные непротессированные формы-предшественники ANGPTL3, а также зрелые формы, полученные в результате посттрансляционного расщепления сигнального пептида, и формы, полученные в результате протеолитического процессинга FBN-подобного домена. Типовая последовательность транскрипта мРНК ANGPTL3 человека является общедоступной (номер доступа в GenBank GI: 41327750 (NM\_014495.2)) и описана в данном документе (SEQ ID NO:128). Типовая последовательность мРНК ANGPTL3 яванского макака является общедоступной (номер доступа GenBank GI: 102136264 (XM\_005543185.2)) и описана в данном документе (SEQ ID NO:129). Типовая последовательность мРНК ANGPTL3 мыши является общедоступной (номер доступа в GenBank GI: 142388354 (NM\_013913.3)) и описана в данном документе (SEQ ID NO:130). Типовая последовательность ANGPTL3 крысы является общедоступной (номер доступа GenBank GI: 68163568 (NM\_001025065.1)) и описана в данном документе (SEQ ID NO:131).

[0052] В контексте данного документа термин «рецептор асиалогликопротеина» или «ASGPR» относится к двусоставному лектину С-типа, образованному основной субъединицей 48 кДа (ASGPR-1) и минорной субъединицей 40 кДа (ASGPR-2). ASGPR преимущественно экспрессируется на синусоидальной поверхности клеток гепатоцитов и играет важную роль в связывании, интернализации и последующем

удалении циркулирующих гликопротеинов, содержащих концевые остатки галактозы или GalNAc (асialogликопротеины).

[0053] В контексте данного документа термины «ослаблять», «ослабление», «ослабляющий» и т.п. относятся к уменьшению или эффективному прекращению. В качестве неограничивающего примера, один или большее количество из описанных в данном документе способов лечения могут уменьшать или эффективно останавливать начало или прогрессирование дислипидемии/гипертриглицеридемии/гиперлипидемии у субъекта. Это ослабление может быть продемонстрировано, например, снижением одного или большего количества аспектов (*например*, симптомов, тканевых характеристик и клеточной, воспалительной или иммунологической активности и т. д.) дислипидемии/гипертриглицеридемии/гиперлипидемии, отсутствием обнаруживаемого прогрессирования (ухудшения) одного или большего количества аспектов дислипидемии/гипертриглицеридемии/гиперлипидемии или отсутствие обнаруживаемых аспектов дислипидемии/гипертриглицеридемии/гиперлипидемии у субъекта, когда их можно было бы ожидать в противном случае.

[0054] В контексте данного документа термин «комплементарный» относится к структурной взаимосвязи между нуклеотидами (*например*, двумя нуклеотидами на противоположных нуклеиновых кислотах или на противоположных областях одной цепи нуклеиновой кислоты), которая позволяет нуклеотидам образовывать пары оснований друг с другом. Например, пуриновый нуклеотид одной нуклеиновой кислоты, комплементарный пиримидиновому нуклеотиду противоположной нуклеиновой кислоты, может образовывать пары оснований вместе, образуя водородные связи друг с другом. В некоторых вариантах осуществления комплементарные нуклеотиды могут образовывать пары оснований по методу Уотсона-Крика или любым другим способом, который позволяет образовывать стабильные дуплексы. В некоторых вариантах осуществления две нуклеиновые кислоты могут иметь области из множества нуклеотидов, которые комплементарны друг другу с образованием областей комплементарности, как описано в данном документе.

[0055] В контексте данного документа термин «дезоксирибонуклеотид» относится к нуклеотиду, имеющему водород вместо гидроксила в 2'-положении его пентозного сахара по сравнению с рибонуклеотидом. Модифицированный дезоксирибонуклеотид представляет собой дезоксирибонуклеотид, имеющий одну или большее количество модификаций или замен атомов, отличных от положения 2', включая модификации или замены сахара, фосфатной группы или основания.

[0056] В контексте данного документа термин «двухцепочечный олигонуклеотид» или «ds олигонуклеотид» относится к олигонуклеотиду, который находится по существу в дуплексной форме. В некоторых вариантах осуществления комплементарное спаривание оснований дуплексной области (областей) ds олигонуклеотида образуется между антипараллельными последовательностями нуклеотидов ковалентно разделенных цепей нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления комплементарное спаривание оснований дуплексной области (областей) ds олигонуклеотида образуется между антипараллельными последовательностями нуклеотидов цепей нуклеиновой кислоты, которые ковалентно связаны. В некоторых вариантах осуществления комплементарное спаривание оснований дуплексной области (областей) ds олигонуклеотида образовано из одной цепи нуклеиновой кислоты, которая свернута (*например*, посредством шпильки) для обеспечения комплементарных антипараллельных последовательностей нуклеотидов, которые соединяются вместе. В некоторых вариантах осуществления ds олигонуклеотид содержит две ковалентно разделенные цепи нуклеиновой кислоты, которые полностью дуплексированы друг с другом. Однако в некоторых вариантах осуществления ds олигонуклеотид включает

две ковалентно разделенные цепи нуклеиновой кислоты, которые частично дуплексированы, (*например*, имеют «липкие» выступы на одном или обоих концах). В некоторых вариантах осуществления ds олигонуклеотид содержит антипараллельные последовательности нуклеотидов, которые частично комплементарны и, таким образом, могут иметь одно или большее количество несовпадений, которые могут включать внутренние несовпадения или концевые несовпадения.

[0057] В контексте данного документа термин «дуплекс», применительно к нуклеиновым кислотам (*например*, олигонуклеотидам), относится к структуре, образованной посредством комплементарного спаривания оснований двух антипараллельных последовательностей нуклеотидов.

[0058] В контексте данного документа термин «эксципиент» относится к нетерапевтическому агенту, который может быть включен в фармацевтическую композицию, например, для обеспечения или достижения необходимой консистенции или стабилизирующего эффекта.

[0059] В контексте данного документа термин «гепатоцит» или «гепатоциты» относится к клеткам паренхиматозных тканей печени. Эти клетки составляют до около 70-85% массы печени и продуцируют сывороточный альбумин, FBN и протромбиновую группу факторов свертывания крови (за исключением Факторов 3 и 4). Маркеры клеток линии гепатоцитов могут включать, помимо прочего: транстиретин (Ttr), глутамин синтетазу (Glul), ядерный фактор гепатоцитов 1a (Hnf1a) и ядерный фактор гепатоцитов 4a (Hnf4a). Маркеры зрелых гепатоцитов могут включать, помимо прочего: цитохром P450 (Cyp3a11), фумарилацетоацетатгидролазу (Fah), глюкозо-6-фосфат (G6p), альбумин (Alb) и OC2-2F8. *См., например*, Huch *et al.* (2013) *Nature* 494:247-250.

[0060] В контексте данного документа термин "гепатотоксический агент" относится к химическому соединению, вирусу или другому веществу, которое само является токсичным для печени или может быть переработано с образованием метаболита, который является токсичным для печени. Гепатотоксические агенты могут включать, помимо прочего, четыреххлористый углерод (CCl<sub>4</sub>), ацетаминофен (парацетамол), винилхлорид, мышьяк, хлороформ, нестероидные противовоспалительные препараты (такие как аспирин и фенилбутазон).

[0061] В контексте данного документа термин "лабильный линкер" означает линкер, который может быть расщеплен (*например*, под действием кислого pH). «Довольно стабильный линкер» относится к линкеру, который не может быть расщеплен.

[0062] В контексте данного документа термин "воспаление печени" или "гепатит" относится к физическому состоянию, при котором печень становится отекающей, дисфункциональной и/или болезненной, особенно в результате травмы или инфекции, что может быть вызвано воздействием гепатотоксического агента. Симптомы могут включать желтуху (пожелтение кожи или глаз), усталость, слабость, тошноту, рвоту, снижение аппетита и потерю веса. Воспаление печени, если его не лечить, может перейти в фиброз, цирроз, печеночную недостаточность или рак печени.

[0063] В контексте данного документа термин «печеночный фиброз» или «фиброз печени» означает чрезмерное накопление в печени белков внеклеточного матрикса, которые могут включать коллагены (I, III и IV), FBN, ундулин, эластин, ламинин, гиалуронан и протеогликаны в результате воспаления и гибели клеток печени. Фиброз печени, если его не лечить, может перейти в цирроз, печеночную недостаточность или рак печени.

[0064] В контексте данного документа термин «петля» относится к неспаренной области нуклеиновой кислоты (*например*, олигонуклеотида), фланкированной двумя антипараллельными областями нуклеиновой кислоты, которые в достаточной степени комплементарны друг другу, так что в соответствующих условиях

гибридизации (*например*, в фосфатном буфере в клетках) две антипараллельные области, фланкирующие неспаренную область, гибридизуются с образованием дуплекса (называемого «стеблем»).

[0065] В контексте данного документа термин «модифицированная межнуклеотидная связь» относится к межнуклеотидной связи, имеющей одну или большее количество химических модификаций по сравнению с эталонной межнуклеотидной связью, содержащей фосфодиэфирную связь. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид представляет собой не встречающуюся в природе связь. Обычно модифицированная межнуклеотидная связь придает одно или большее количество желаемых свойств нуклеиновой кислоте, в которой присутствует модифицированная межнуклеотидная связь. Например, модифицированный нуклеотид может улучшить термическую стабильность, устойчивость к разложению, устойчивость к нуклеазам, растворимость, биодоступность, биоактивность, снижение иммуногенности и *т. д.*

[0066] В контексте данного документа термин «модифицированный нуклеотид» относится к нуклеотиду, имеющему одну или большее количество химических модификаций по сравнению с соответствующим контрольным нуклеотидом, выбранным из: аденин-рибонуклеотида, гуанин-рибонуклеотида, цитозин-рибонуклеотида, урацил-рибонуклеотида, аденин-дезоксирибонуклеотида, гуанин-дезоксирибонуклеотида, цитозин-дезоксирибонуклеотида и тимидин-дезоксирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид представляет собой не встречающийся в природе нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид имеет одну или большее количество химических модификаций в своем сахаре, азотистом основании и/или фосфатной группе. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид имеет один или большее количество химических фрагментов, конъюгированных с соответствующим эталонным нуклеотидом. Обычно модифицированный нуклеотид придает одно или большее количество желаемых свойств нуклеиновой кислоте, в которой присутствует этот модифицированный нуклеотид. Например, модифицированный нуклеотид может улучшить термическую стабильность, устойчивость к разложению, устойчивость к нуклеазам, растворимость, биодоступность, биоактивность, снижение иммуногенности и *т. д.*

[0067] В контексте данного документа термин «структура тетрапетли с разрывами» относится к структуре олигонуклеотида РНК<sub>i</sub>, который характеризуется отдельными смысловой (сопровождающей) и антисмысловой (направляющей) цепями, при этом смысловая цепь имеет область, комплементарную антисмысловой цепи, и при этом по меньшей мере одна из цепей, как правило, смысловая цепь, имеет тетрапетлю, сконфигурированную для стабилизации соседней области стебля, образованной в пределах по меньшей мере одной цепи.

[0068] В контексте данного документа термин «олигонуклеотид» относится к короткой нуклеиновой кислоте, *например*, длиной менее чем около 100 нуклеотидов. Олигонуклеотид может быть одноцепочечным (ss) или ds. Олигонуклеотид может иметь или не иметь дуплексные области. В качестве неограничивающих примеров олигонуклеотид может представлять собой, помимо прочего, малую интерферирующую РНК (siРНК), микроРНК (miРНК), короткую шпилечную РНК (shРНК), дайсер-субстратную интерферирующую РНК (dsiРНК), антисмысловой олигонуклеотид, короткую siРНК или ss siРНК. В некоторых вариантах осуществления ds олигонуклеотид представляет собой олигонуклеотид РНК<sub>i</sub>.

[0069] В контексте данного документа термин «липкий конец» относится к концевым нуклеотидам, не образующим пары оснований, возникающим из одной цепи или области, выходящей за пределы конца комплементарной цепи, с которой одна цепь или область образует дуплекс. В некоторых вариантах осуществления липкий конец включает один или большее количество неспаренных нуклеотидов, отходящих

от дуплексной области на 5'-конце или 3'-конце двухцепочечного олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления липкий конец представляет собой 3'- или 5'-выступ на антисмысловой цепи или смысловой цепи ds олигонуклеотида.

[0070] В контексте данного документа термин «фосфатный аналог» относится к химическому фрагменту, который имитирует электростатические и/или стерические свойства фосфатной группы. В некоторых вариантах осуществления фосфатный аналог расположен на 5'-концевом нуклеотиде олигонуклеотида вместо 5'-фосфата, который часто подвержен ферментативному удалению. В некоторых вариантах осуществления 5'-фосфатный аналог содержит устойчивую связь к фосфатазе. Примеры фосфатных аналогов включают, помимо прочего, 5'-фосфонаты, такие как 5'-метиленфосфонат (5'-MP) и 5'-(Е)-винилфосфонат (5'-VP). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет фосфатный аналог в 4'-углеродном положении сахара (называемый «4'-фосфатным аналогом») на 5'-концевом нуклеотиде. Примером 4'-фосфатного аналога является оксиметилфосфонат, в котором атом кислорода оксиметильной группы связан с сахарным фрагментом (*например*, с его 4'-углеродом) или его аналогом. *См.*, *например*, предварительные патентные заявки США №№ 62/383 207 (подана 2 сентября 2016 года) и 62/393 401 (подана 12 сентября 2016 года). Для 5'-конца олигонуклеотидов были разработаны другие модификации (*см.*, *например*, Intl. патентная заявка № WO 2011/133871; патент США № 8 927 513; и Prakash *et al.* (2015) *Nucleic Acids Res.* 43:2993-3011).

[0071] В контексте данного документа термин "сниженная экспрессия" гена (*например*, ANGPTL3) означает снижение количества или уровня транскрипта РНК (*например*, ANGPTL3 мРНК) или белка, кодируемого геном, и/или снижение количества или уровня активности гена в клетке, популяции клеток, образце или субъекте по сравнению с соответствующим эталоном (*например*, эталонной клеткой, популяцией клеток, образцом или субъектом). Например, процесс контактирования клетки с олигонуклеотидом по настоящему изобретению (*например*, олигонуклеотидом, содержащим антисмысловую цепь, имеющую нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности, содержащей мРНК ANGPTL3), может привести к снижению количества или уровня мРНК ANGPTL3, белка и/или активности (*например*, в результате деградации мРНК ANGPTL3 посредством пути РНКi) по сравнению с клеткой, которую не обрабатывали ds олигонуклеотидом. Аналогичным образом и в контексте данного документа термин «снижение экспрессии» относится к действию, которое приводит к снижению экспрессии гена (*например*, ANGPTL3). В контексте данного документа термин «снижение экспрессии ANGPTL3» относится к снижению количества или уровня мРНК ANGPTL3, белка ANGPTL3 и/или активности ANGPTL3 в клетке, популяции клеток, образце или субъекте по сравнению с соответствующим эталоном (*например*, эталонной клеткой, популяцией клеток, образцом или субъектом).

[0072] В контексте данного документа термин «область комплементарности» относится к последовательности нуклеотидов нуклеиновой кислоты (*например*, ds олигонуклеотида), которая в достаточной степени комплементарна антипараллельной последовательности нуклеотидов для обеспечения гибридизации между двумя последовательностями нуклеотидов в соответствующих условиях гибридизации (*например*, в фосфатном буфере, в клетке и *т. д.*). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает нацеливающую последовательность, имеющую область, комплементарную целевой последовательности мРНК.

[0073] В контексте данного документа термин «рибонуклеотид» относится к нуклеотиду, имеющему рибозу в качестве пентозного сахара, который содержит гидроксильную группу в своем 2'-положении. Модифицированный рибонуклеотид представляет собой рибонуклеотид, имеющий одну или большее

количество модификаций или замен атомов, отличных от положения 2', включая модификации или замены в рибозе, фосфатной группе или основании.

[0074] В контексте данного документа термин «олигонуклеотид РНКi» относится либо к (a) ds олигонуклеотиду, имеющему смысловую цепь (сопровождающую) и антисмысловую цепь (направляющую), в котором антисмысловая цепь или часть антисмысловой цепи используется эндонуклеазой Argonaute 2 (Ago2) при расщеплении целевой мРНК, или (b) ss олигонуклеотиду, имеющим одну антисмысловую цепь, при этом эта антисмысловая цепь (или часть этой антисмысловой цепи) используется эндонуклеазой Ago2 при расщеплении целевой мРНК.

[0075] В контексте данного документа термин «цепь» относится к одной непрерывной последовательности нуклеотидов, связанных вместе межнуклеотидными связями (*например*, фосфодиэфирные связи, фосфоротиоатные связи). В некоторых вариантах осуществления цепь имеет два свободных конца, (*например* 5'-конец и 3'-конец).

[0076] В контексте данного документа термин «субъект» означает любое млекопитающее, включая мышей, кроликов и людей. В одном варианте осуществления субъектом является человек или NHP. Более того, термины «индивидуум» или «пациент» могут использоваться как синонимы термина «субъект».

[0077] В контексте данного документа термин «синтетический» относится к нуклеиновой кислоте или другой молекуле, которая синтезируется искусственно (*например*, с помощью машины (*например*, твердотельный синтезатор нуклеиновых кислот)) или которая иным образом не является производной от природного источника (*например*, клетки или организма), который обычно продуцирует молекулу.

[0078] В контексте данного документа термин «нацеливающийся лиганд» относится к молекуле (*например*, углеводов, аминоксахар, холестерин, полипептид или липид), которая избирательно связывается с родственной молекулой (*например*, рецептором) ткани или клетки, представляющих интерес, и которая конъюгируется с другим веществом с целью нацеливания другого вещества на ткань или клетку, которые представляют интерес. Например, в некоторых вариантах осуществления нацеливающийся лиганд может быть конъюгирован с олигонуклеотидом с целью нацеливания олигонуклеотида на конкретную ткань или клетку, которые представляют интерес. В некоторых вариантах осуществления нацеливающийся лиганд избирательно связывается с рецептором клеточной поверхности. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления нацеливающийся лиганд при конъюгировании с олигонуклеотидом способствует доставке олигонуклеотида в конкретную клетку посредством селективного связывания с рецептором, экспрессируемым на поверхности клетки, и эндосомной интернализации клеткой комплекса, содержащего олигонуклеотид, нацеливающий лиганд и рецептор. В некоторых вариантах осуществления нацеливающийся лиганд конъюгирован с олигонуклеотидом через линкер, который расщепляется после или во время клеточной интернализации, так что олигонуклеотид высвобождается из нацеливающего лиганда в клетке.

[0079] В контексте данного документа термин «тетрапетля» относится к петле, которая увеличивает стабильность смежного дуплекса, образованного гибридизацией фланкирующих последовательностей нуклеотидов. Повышение стабильности обнаруживается как повышение температуры плавления ( $T_m$ ) смежного дуплекса стебля, которая выше, чем  $T_m$  смежного дуплекса стебля, ожидаемая средняя температура от набора петель сопоставимой длины, состоящих из случайно выбранных последовательностей нуклеотидов. Например, тетрапетля может обеспечивать температуру плавления по меньшей мере около 50 °C, по меньшей мере около 55 °C, по меньшей мере около 56 °C, по меньшей мере около 58 °C, по меньшей мере около 60 °C, по меньшей мере около 65 °C или по меньшей мере около 75 °C в 10 mM NaHPO<sub>4</sub> к шпильке, содержащей дуплекс длиной по меньшей мере 2 пары оснований (bp). В некоторых вариантах осуществления тетрапетля

может стабилизировать bp в смежном дуплексе стебля за счет стэкинг-взаимодействий. Кроме того, взаимодействия между нуклеотидами в тетрапетле включают, помимо прочего, спаривание оснований не по Ватсону-Крику, стэкинг-взаимодействия, водородные связи и контактные взаимодействия (Cheong *et al.* (1990) *Nature* 346:680-682; Heus & Pardi (1991) *Science* 253:191-194). В некоторых вариантах осуществления тетрапетля содержит или состоит из 3 - 6 нуклеотидов, обычно из 4 - 5 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления тетрапетля содержит или состоит из 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов, которые могут быть или могут не быть модифицированы (*например*, которые могут быть или могут не быть конъюгированы с нацеливающимся фрагментом). В одном варианте осуществления тетрапетля состоит из 4 нуклеотидов. В тетрапетле может применяться любой нуклеотид, а также могут применяться стандартные символы IUPAC-IUB для таких нуклеотидов, как описано в публикации Cornish-Bowden, (1985) *Nucleic Acids Res.* 13:3021-3030. Например, буква «N» может применяться для обозначения того, что любое основание может находиться в этом положении, буква «R» может применяться, чтобы продемонстрировать, что А (аденин) или G (гуанин) могут находиться в этом положении, и «B» может применяться, чтобы продемонстрировать, что С (цитозин), G (гуанин) или Т (тимин) могут находиться в этом положении. Примеры тетрапетель включают семейство тетрапетель UNCG (*например*, UUCG), семейство тетрапетель GNRA (*например*, GAAA) и тетрапетлю CUUG (Woese *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8467-8471; Antao *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:5901-5905). Примеры тетрапетель ДНК включают семейство тетрапетель d(GNNA) (*например*, d(GTTA)), семейство тетрапетель d(GNRA), семейство тетрапетель d(GNAB), семейство тетрапетель d(CNNG) и семейство тетрапетель d(TNCG) (*например*, d(TTCG)). См., *например*, Nakano *et al.* (2002) *Biochem.* 41:4281-14292; Shinji *et al.* (2000) *Nippon Kagakkai Koen Yokoshu* 78:731. В некоторых вариантах осуществления тетрапетля содержится в структуре тетрапетли с разрывом.

[0080] В контексте данного документа термин «лечить» или «лечение» относится к оказанию помощи субъекту, который в этом нуждается, например, посредством введения терапевтического агента (*например*, олигонуклеотида, описанного в данном документе) субъекту в целях улучшения здоровья и/или самочувствия субъекта в отношении существующего патологического состояния (*например*, заболевания, нарушения) или для предотвращения или уменьшения вероятности возникновения патологического состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение включает снижение частоты или тяжести по меньшей мере одного признака, симптома или способствующего фактора патологического состояния (*например*, заболевания, нарушения), испытываемого субъектом.

[0081] II. Олигонуклеотидные ингибиторы экспрессии ANGPTL3

[0082] В настоящем изобретении предлагаются, *в частности*, олигонуклеотиды, ингибирующие экспрессию ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, ингибирующий экспрессию ANGPTL3, нацелен на мРНК ANGPTL3.

[0083] i. Целевые последовательности ANGPTL3

[0084] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид нацелен на целевую последовательность, включающую мРНК ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид или его часть, фрагмент или цепь (*например*, антисмысловая нить или направляющая нить ds олигонуклеотида) связывается или отжигается с целевой последовательностью, включающей мРНК ANGPTL3, тем самым подавляя экспрессию ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид нацелен на целевую последовательность ANGPTL3 с целью ингибирования экспрессии ANGPTL3 *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления количество или степень ингибирования экспрессии ANGPTL3 олигонуклеотидом,

нацеленным на целевую последовательность ANGPTL3, коррелирует с активностью олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления количество или степень ингибирования экспрессии ANGPTL3 олигонуклеотидом, нацеленным на целевую последовательность ANGPTL3, коррелирует с количеством или степенью терапевтического эффекта у субъекта или пациента, имеющего заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, подвергаемого лечению олигонуклеотидом.

[0085] Путем исследования нуклеотидной последовательности мРНК, кодирующих ANGPTL3, включая мРНК множества различных видов (*например*, человека, яванского макака, мыши и крысы; *см.*, *например*, Пример 1), а также в результате тестирования *in vitro* и *in vivo* (*см.*, *например*, Пример 2 и Пример 3), было обнаружено, что некоторые нуклеотидные последовательности мРНК ANGPTL3 в большей степени, чем другие, поддаются ингибированию на основе олигонуклеотидов и, таким образом, могут использоваться в качестве целевых последовательностей для олигонуклеотидов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь олигонуклеотида (*например*, ds олигонуклеотида), описанного в данном документе (*например*, в Таблице 5), содержит целевую последовательность ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления часть или область смысловой цепи ds олигонуклеотида, описанного в данном документе (*например*, в Таблице 5), содержит целевую последовательность ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность ANGPTL3 содержит или состоит из последовательности любой из SEQ ID NO: 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126 и 127.

[0086] ii. Последовательности, нацеливающиеся на ANGPTL3

[0087] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по настоящему изобретению имеют области, комплементарные мРНК ANGPTL3 (*например*, в пределах целевой последовательности мРНК ANGPTL3) для нацеливания на мРНК в клетках и ингибирования ее экспрессии. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по настоящему изобретению содержат последовательность, нацеливающуюся на ANGPTL3 (*например*, антисмысловую цепь или направляющую цепь ds олигонуклеотида), имеющую область комплементарности, которая связывается или отжигается с целевой последовательностью ANGPTL3 путем комплементарного (по Уотсону-Крику) спаривания оснований. Нацеливающаяся последовательность или область комплементарности, как правило, имеют подходящую длину и содержание оснований, чтобы сделать возможным связывание или отжиг олигонуклеотида (или его цепи) с мРНК ANGPTL3 в целях ингибирования ее экспрессии. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность или область комплементарности имеет длину по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 21, по меньшей мере около 22, по меньшей мере около 23, по меньшей мере около 24, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 26, по меньшей мере около 27, по меньшей мере около 28, по меньшей мере около 29 или по меньшей мере около 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность или область комплементарности составляет от около 12 до около 30 (*например*, от 12 до 30, от 12 до 22, от 15 до 25, от 17 до 21, от 18 до 27, от 19 до 27 или от 15 до 30) нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность или область комплементарности составляет около 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность или область комплементарности имеет длину 18 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность или область комплементарности имеет длину 19 нуклеотидов. В

некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность или область комплементарности имеет длину 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность или область комплементарности имеет длину 21 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность или область комплементарности имеет длину 22 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность или область комплементарности имеет длину 23 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность или область комплементарности имеет длину 24 нуклеотидов.

[0088] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит нацеливающуюся последовательность или область комплементарности (*например*, антисмысловую цепь или направляющую цепь двухцепочечного олигонуклеотида), которые полностью комплементарны целевой последовательности ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность или область комплементарности частично комплементарна целевой последовательности ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит нацеливающуюся последовательность или область комплементарности, которая полностью комплементарна последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113 и 115. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит нацеливающуюся последовательность или область комплементарности, которые частично комплементарны последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113 и 115.

[0089] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит нацеливающуюся последовательность или область комплементарности, которые комплементарны непрерывной последовательности нуклеотидов, содержащей мРНК ANGPTL3, при этом непрерывная последовательность нуклеотидов имеет длину от примерно 12 до примерно 30 нуклеотидов (*например*, от 12 до 30, от 12 до 28, от 12 до 26, от 12 до 24, от 12 до 20, от 12 до 18, от 12 до 16, от 14 до 22, от 16 до 20, от 18 до 20 или от 18 до 19 нуклеотидов в длину). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит нацеливающую последовательность или область комплементарности, комплементарную непрерывной последовательности нуклеотидов, содержащей мРНК ANGPTL3, при этом непрерывная последовательность нуклеотидов составляет 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит нацеливающуюся последовательность или область комплементарности, которые комплементарны непрерывной последовательности нуклеотидов, содержащей мРНК ANGPTL3, при этом непрерывная последовательность нуклеотидов имеет 19 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит нацеливающуюся последовательность или область комплементарности, которая комплементарна непрерывной последовательности нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113 и 115, необязательно при этом длина непрерывной последовательности нуклеотидов составляет 19 нуклеотидов.

[0090] В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность или область комплементарности олигонуклеотида, являющаяся комплементарной смежным нуклеотидам в последовательности, как указано в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93,

95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113 и 115, охватывает всю длину антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности олигонуклеотида является комплементарной смежным нуклеотидам последовательности, как указано в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113 и 115, охватывает часть всей длины антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит область комплементарности (*например*, на антисмысловой цепи ds олигонуклеотида), которая по меньшей мере частично (*например*, полностью) комплементарна непрерывному участку нуклеотидов, охватывающему нуклеотиды 1-20 последовательности, как указано в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113 и 115.

[0091] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит нацеливающуюся последовательность или область комплементарности, имеющую одно или большее количество bp несовпадений с соответствующей целевой последовательностью ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся последовательность или область комплементарности может иметь до около 1, до около 2, до около 3, до около 4, до около 5 и *т.д.* несовпадений с соответствующей целевой последовательностью ANGPTL3 при условии сохранения способности нацеливающей последовательности или области комплементарности связываться или отжигать с мРНК ANGPTL3 в соответствующих условиях гибридизации и/или способности олигонуклеотида подавлять экспрессию ANGPTL3. В альтернативном варианте нацеливающаяся последовательность или область комплементарности могут иметь не более 1, не более 2, не более 3, не более 4 или не более 5 несовпадений с соответствующей целевой последовательностью ANGPTL3 при условии сохранения способности нацеливающей последовательности или области комплементарности связываться или отжигать с мРНК ANGPTL3 в соответствующих условиях гибридизации и/или способности олигонуклеотида подавлять экспрессию ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит нацеливающуюся последовательность или область комплементарности, имеющую 1 несовпадение с соответствующей целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит нацеливающуюся последовательность или область комплементарности, имеющую 2 несовпадения с соответствующей целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит нацеливающуюся последовательность или область комплементарности, имеющую 3 несовпадения с соответствующей целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит нацеливающуюся последовательность или область комплементарности, имеющую 4 несовпадения с соответствующей целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит нацеливающуюся последовательность или область комплементарности, имеющую 5 несовпадений с соответствующей целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает нацеливающуюся последовательность или область комплементарности более чем с одним несовпадением (*например*, 2, 3, 4, 5 или более несовпадений) с соответствующей целевой последовательностью, при этом по меньшей мере 2 (*например*, все) из несовпадений расположены последовательно (*например*, 2, 3, 4, 5 или более несовпадений подряд), или при этом несовпадения перемежаются по всей нацеливающейся последовательности или области комплементарности.

[0092] iii. Типы олигонуклеотидов

[0093] Различные типы и/или структуры олигонуклеотидов применимы для нацеливания на ANGPTL3 в способах, описанных в данном документе, включая, помимо прочего, олигонуклеотиды РНКi, антисмысловые олигонуклеотиды, miРНК и т. д. Любой из типов олигонуклеотидов, описанных в данном документе или в других местах, может применяться в качестве каркаса для включения в него последовательности, нацеливающейся на ANGPTL3.

[0094] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды, описанных в данном документе, ингибируют экспрессию ANGPTL3 путем взаимодействия с путями РНК-интерференции (РНКi), расположенных выше или ниже от вовлечения фермента Дайсер. Например, были разработаны олигонуклеотиды РНКi, каждая цепь которых имеет размер около 19-25 нуклеотидов с по меньшей мере одним 3'-липким концом от 1 до 5 нуклеотидов (см., например, патент США № 8 372 968). Также были разработаны более длинные олигонуклеотиды, которые процессируются посредством фермента Дайсер для создания активных продуктов РНКi (см., например, патент США № 8 883 996). В ходе дальнейшей работы были получены удлиненные ds олигонуклеотиды, в которых по меньшей мере один конец по меньшей мере одной цепи удлинен за пределы области нацеливания дуплекса, включая структуры, в которых одна из цепей включает термодинамически стабилизированную тетралуповую структуру (см., например, патенты США №№ 8 513 207 и 8 927 705, а также Международную публикацию заявки на патент № WO 2010/033225). Такие структуры могут включать ss-удлинения (с одной или обеих сторон молекулы), а также ds-удлинения.

[0095] В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды, описанные в настоящем документе, взаимодействуют с путем РНКi ниже от вовлечения фермента Дайсер (например, расщепление Дайсером). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет липкий конец (например, длиной 1, 2 или 3 нуклеотида) на 3'-конце смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид (например, siРНК) содержит направляющую цепь из 21 нуклеотида, которая является антисмысловой по отношению к целевой РНК, и комплементарную сопровождающую цепь, при этом обе цепи отжигаются с образованием дуплекса из 19-bp п.н. и 2 липких нуклеотида на одном или обоих 3'-концах. Также доступны более длинные конструкции олигонуклеотидов, включая олигонуклеотиды, имеющие направляющую цепь из 23 нуклеотидов и сопровождающую цепь из 21 нуклеотида, где имеется тупой конец на правой стороне молекулы (3'-конец сопровождающей цепи/5'-конец направляющей цепи) и двухнуклеотидную 3'-направляющую цепь, липкую с левой стороны молекулы (5'-конец сопровождающей цепи/3'-конец направляющей цепи). В таких молекулах имеется дуплексная область длиной 21 bp. См., например, патенты США № 9 012 138; 9 012 621 и 9 193 753

[0096] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по настоящему изобретению содержат смысловую и антисмысловую цепи, каждая из которых имеет длину от около 17 до 26 (например, от 17 до 26, от 20 до 25 или от 21 до 23) нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит смысловую и антисмысловую цепи, каждая из которых имеет длину около 19-22 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи имеют одинаковую длину. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит смысловую и антисмысловую цепи, так что имеется 3'-липкий конец либо на смысловой, либо на антисмысловой цепи, либо как на смысловой, так и на антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления для олигонуклеотидов, которые имеют смысловую и антисмысловую цепи, длина которых находится в диапазоне около 21-23 нуклеотидов, 3'-липкий конец на смысловой, антисмысловой, либо как смысловой, так и антисмысловой цепях составляет 1 или 2 нуклеотида в длину. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет направляющую цепь из 22 нуклеотидов и сопровождающую цепь из 20 нуклеотида,

где имеется тупой конец на правой стороне молекулы (3'-конец сопровождающей цепи/5'-конец направляющей цепи) и двухнуклеотидную 3'-направляющую цепь, липкую с левой стороны молекулы (5'-конец сопровождающей цепи/3'-конец направляющей цепи). В таких молекулах имеется дуплексная область длиной 20 bp.

[0097] Другие конструкции олигонуклеотидов для применения с композициями и способами, описанными в данном документе, включают: 16-мерные siPHK (см., например, NUCLEIC ACIDS IN CHEMISTRY AND BIOLOGY. Blackburn (ed.), Royal Society of Chemistry, 2006), shPHK (например, имеющие стебли длиной 19 bp или короче; см., например, Moore *et al.* (2010) *Methods Mol. Biol.* 629:141-158), тупые siPHK (например, длиной 19 bp; см., например, Kraynack & Baker (2006) *RNA* 12:163-176), асимметричные siPHK (aiPHK; см., например, Sun *et al.* (2008) *Nat. Biotechnol.* 26:1379-1382), асимметричную более короткую дуплексную siPHK (см., например, Chang *et al.* (2009) *Mol. Ther.* 17:725-732), разветвленные siPHK (см., например, Hohljoh (2004) *FEBS Lett.* 557:193-198), ss siPHK (Elsner (2012) *Nat. Biotechnol.* 30:1063), гантелеобразные кольцевые siPHK (см., например, Abe *et al.* (2007) *J. Am. Chem. Soc.* 129:15108-15109), и малую внутренне сегментированную интерферирующую РНК (siPHK; см., например, Bramsen *et al.* (2007) *Nucleic Acids Res.* 35:5886-5897). Другими неограничивающими примерами олигонуклеотидных структур, которые можно применять в некоторых вариантах осуществления для снижения или ингибирования экспрессии ANGPTL3, являются микроРНК (miPHK), короткая шпилечная РНК (shPHK) и короткая siPHK (см., например, Hamilton *et al.* (2002) *EMBO J.* 21:4671-4679; см. также Публикацию заявки на патент США № 2009/0099115).

[0098] Тем не менее, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для снижения или ингибирования экспрессии ANGPTL3 по настоящему изобретению представляет собой ss. Такие структуры могут включать, помимо прочего, молекулы ss РНКi. Недавние исследования продемонстрировали активность молекул ss РНКi (см., например, Matsui *et al.* (2016) *Mol. Ther.* 24:946-955). Однако в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по настоящему изобретению представляют собой антисмысловые олигонуклеотиды (ASO). Антисмысловой олигонуклеотид представляет собой ss олигонуклеотид, который имеет последовательность азотистых оснований, которая при записи в направлении от 5' к 3' содержит реверс-комплемент целевого сегмента конкретной нуклеиновой кислоты, и соответствующим образом модифицирована (например, в виде гэммера), для индукции опосредованного РНКазой Н расщепления целевой РНК в клетках или (например, в виде миксмера) для ингибирования трансляции целевой мРНК в клетках. ASO для применения согласно настоящему изобретению могут быть модифицированы любым подходящим способом, известным в данной области техники, включая, например, как описано в патенте США № 9 567 587 (включая, например, длину, сахарные остатки азотистого основания (пиримидин, пурин) и изменения гетероциклической части азотистого основания). Кроме того, ASO десятилетиями применяли для снижения экспрессии определенных целевых генов (см., например, Bennett *et al.* (2017) *Annu. Rev. Pharmacol.* 57:81-105).

[0099] iv. Двухцепочечные олигонуклеотиды

[00100] В настоящем изобретении предлагаются ds олигонуклеотиды для нацеливания на мРНК ANGPTL3 и ингибирования экспрессии ANGPTL3 (например, посредством пути РНКi), содержащие смысловую цепь (также называемую в настоящем документе сопровождающей цепью) и антисмысловую цепь (также называемую в настоящем документе направляющей цепью). В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь и антисмысловая цепь представляют собой отдельные цепи и не связаны ковалентно. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь и антисмысловая цепь ковалентно связаны.

[00101] В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь имеет первую область (R1) и вторую область (R2), при этом R2 содержит первую подобласть (S1), тетрапетлю (L) или трипетлю (triL) и вторую подобласть (S2), при этом L или triL расположены между S1 и S2, и при этом S1 и S2 образуют второй дуплекс (D2). D2 может иметь различную длину. В некоторых вариантах осуществления D2 имеет длину около 1-6 bp. В некоторых вариантах осуществления D2 имеет длину 2-6, 3-6, 4-6, 5-6, 1-5, 2-5, 3-5 или 4-5 bp. В некоторых вариантах осуществления D2 имеет длину 1, 2, 3, 4, 5 или 6 bp. В некоторых вариантах осуществления D2 имеет длину 6 bp.

[00102] В некоторых вариантах осуществления R1 смысловой цепи и антисмысловая цепь образуют первый дуплекс (D1). В некоторых вариантах осуществления длина D1 составляет по меньшей мере около 15 (*например*, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 21) нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина D1 составляет от 12 до 30 нуклеотидов (*например*, от 12 до 30, от 12 до 27, от 15 до 22, от 18 до 22, от 18 до 25, от 18 до 27, от 18 до 30 или от 21 до 30 нуклеотидов в длину). В некоторых вариантах осуществления длина D1 составляет по меньшей мере 12 нуклеотидов (*например*, по меньшей мере 12, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 30 нуклеотидов в длину). В некоторых вариантах осуществления D1 имеет длину 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления D1 имеет длину 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления D1, содержащий смысловую цепь и антисмысловую цепь, не охватывает всю длину смысловой цепи и/или антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления D1, содержащий смысловую цепь и антисмысловую цепь, охватывает всю длину либо смысловой цепи, либо антисмысловой цепи, либо обеих. В некоторых вариантах осуществления D1, содержащий смысловую цепь и антисмысловую цепь, охватывает всю длину всю длину как смысловой, так и антисмысловой цепи.

[00103] В некоторых вариантах осуществления ds олигонуклеотид содержит смысловую цепь, имеющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113 и 115, и антисмысловую цепь, содержащую комплементарную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114 и 116, как указано в **Таблице 3**. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 99, а антисмысловая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 100.

[00104] В некоторых вариантах осуществления ds олигонуклеотид содержит смысловую цепь, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 19, 25, 49, 71, 73, 75, 79, 99, 101, 103 и 113, и антисмысловую цепь, содержащую комплементарную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20, 26, 50, 72, 74, 76, 80, 100, 102, 104 и 114, как указано в **Таблице 4**. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 99, а антисмысловая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 100.

[00105] Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления, на последовательности, представленные в Перечне последовательностей, можно сослаться при описании структуры олигонуклеотида или другой нуклеиновой кислоты. В таких вариантах осуществления фактический олигонуклеотид или другая нуклеиновая кислота может иметь один или большее количество альтернативных нуклеотидов (*например*, РНК-аналог нуклеотида ДНК или ДНК-аналог нуклеотида РНК), и/или один или большее количество модифицированных нуклеотидов, и/или один или большее количество модифицированных межнуклеотидных

связей, и/или одну или большее количество других модификаций по сравнению с указанной последовательностью, сохраняя при этом по существу такие же или аналогичные комплементарные свойства, что и указанная последовательность.

[00106] В некоторых вариантах осуществления ds олигонуклеотид содержит смысловую цепь из 25 нуклеотидов и антисмысловую цепь из 27 нуклеотидов, которые при действии фермента Дайсер приводят к образованию антисмысловой цепи, которая включается в зрелый RISC. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь ds олигонуклеотида длиннее 27 нуклеотидов (*например*, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь двухцепочечного олигонуклеотида длиннее 25 нуклеотидов (*например*, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов).

[00107] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по настоящему изобретению имеют один 5'-конец, который термодинамически менее стабилен по сравнению с другим 5'-концом. В некоторых вариантах осуществления предлагается асимметрический олигонуклеотид, который включает тупой конец на 3'-конце смысловой цепи и 3'-липкий конец на 3'-конце антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления 3'-липкий конец на антисмысловой цепи имеет длину около 1-8 нуклеотидов (*например*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 нуклеотидов в длину). Как правило, олигонуклеотид для РНКi имеет липкий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой (направляющей) цепи. Однако возможны и другие липкие концы. В некоторых вариантах осуществления липкий конец представляет собой 3'-липкий конец длиной от 1 до 6 нуклеотидов, необязательно от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4, от 2 до 3, от 3 до 6, от 3 до 5, от 3 до 4, от 4 до 6, от 4 до 5, от 5 до 6 нуклеотидов или 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. Однако, в некоторых вариантах осуществления липкий конец представляет собой 5'-липкий конец длиной от 1 до 6 нуклеотидов, необязательно от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4, от 2 до 3, от 3 до 6, от 3 до 5, от 3 до 4, от 4 до 6, от 4 до 5, от 5 до 6 нуклеотидов или 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов.

[00108] В некоторых вариантах осуществления модифицированы два концевых нуклеотида на 3'-конце антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления два концевых нуклеотида на 3'-конце антисмысловой цепи комплементарны цели. В некоторых вариантах осуществления два концевых нуклеотида на 3'-конце антисмысловой цепи не комплементарны цели. В некоторых вариантах осуществления два концевых нуклеотида на каждом 3'-конце олигонуклеотида в структуре тетрапетли с разрывом представляют собой GG. Как правило, один или оба из двух концевых нуклеотидов GG на каждом 3'-конце олигонуклеотида не комплементарны цели.

[00109] В некоторых вариантах осуществления между смысловой и антисмысловой цепью имеется одно или большее количество (*например*, 1, 2, 3, 4 или 5) несовпадений. Если между смысловой и антисмысловой нитью имеется более одного несовпадения, они могут располагаться последовательно (*например*, 2, 3 или более в ряд) или перемежаться по всей области комплементарности. В некоторых вариантах осуществления 3'-конец смысловой цепи содержит одно или большее количество несовпадений. В одном варианте осуществления два несовпадения включаются на 3' конце смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления несовпадения оснований или дестабилизация сегментов на 3' конце смысловой цепи олигонуклеотида улучшали активность синтетических дуплексов в РНКi, возможно, за счет облегчения процессинга посредством фермента Дайсер.

[00110] а. Антисмысловые цепи

[00111] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, описанный в данном документе для нацеливания на ANGPTL3, содержит антисмысловую цепь, содержащую или состоящую из последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32,

34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114 и 116. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит антисмысловую цепь, содержащую или состоящую из по меньшей мере около 12 (*например*, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22 или по меньшей мере 23) смежных нуклеотидов последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, и 116.

[00112] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид ds содержит антисмысловую цепь длиной до около 40 нуклеотидов (*например*, до 40, до 35, до 30, до 27, до 25, до 21, до 19, до 17 или до 12 нуклеотидов в длину). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь антисмысловую цепь длиной по меньшей мере около 12 нуклеотидов (*например*, по меньшей мере 12, по меньшей мере 15, по меньшей мере 19, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 25, по меньшей мере 27, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35 или по меньшей мере 38 нуклеотидов в длину). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь антисмысловую цепь в диапазоне от около 12 до около 40 (*например*, от 12 до 40, от 12 до 36, от 12 до 32, от 12 до 28, от 15 до 40, от 15 до 36, от 15 до 32, от 15 до 28, от 17 до 22, от 17 до 25, от 19 до 27, от 19 до 30, от 20 до 40, от 22 до 40, от 25 до 40 или от 32 до 40) нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь антисмысловую цепь из 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 или 40 нуклеотидов в длину.

[00113] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь олигонуклеотида может называться «направляющей цепью». Например, если антисмысловая цепь может взаимодействовать с РНК-индуцированным «молчащим» комплексом (RISC) и связываться с белком Argonaute, таким как Ago2, или взаимодействовать или связываться с одним или большим количеством подобных факторов, а также непосредственно подавлять целевой ген, она может называться направляющей цепью. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь, комплементарная направляющей цепи, может называться «сопровождающей цепью».

[00114] b. Смысловые цепи

[00115] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, описанный в данном документе для нацеливания на ANGPTL3, содержит последовательность смысловой цепи или состоит из нее, как указано в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113 и 115. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет смысловую цепь, которая содержит или состоит из по меньшей мере около 12 (*например*, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22 или по меньшей мере 23) смежных нуклеотидов последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113 и 115.

[00116] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит смысловую цепь (или сопровождающую цепь) длиной до около 40 нуклеотидов (*например*, до 40, до 36, до 30, до 27, до 25, до 21,

до 19, до 17 или до 12 нуклеотидов в длину). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь смысловую цепь длиной по меньшей мере около 12 нуклеотидов (*например*, по меньшей мере 12, по меньшей мере 15, по меньшей мере 19, по меньшей мере 21, по меньшей мере 25, по меньшей мере 27, по меньшей мере 30, по меньшей мере 36 или по меньшей мере 38 нуклеотидов в длину). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь смысловую цепь в диапазоне от около 12 до около 40 (*например*, от 12 до 40, от 12 до 36, от 12 до 32, от 12 до 28, от 15 до 40, от 15 до 36, от 15 до 32, от 15 до 28, от 17 до 21, от 17 до 25, от 19 до 27, от 19 до 30, от 20 до 40, от 22 до 40, от 25 до 40 или от 32 до 40) нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь смысловую цепь из 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 или 40 нуклеотидов в длину.

[00117] В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит структуру «стебель - петля» на своем 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит структуру «стебель - петля» на своем 5'-конце. В некоторых вариантах осуществления стебель представляет собой дуплекс длиной 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 bp. В некоторых вариантах осуществления «стебель-петля» обеспечивает защиту молекулы от деградации (*например*, ферментативной деградации) и облегчает нацеливание для доставки в целевую клетку. Например, в некоторых вариантах осуществления петля обеспечивает добавление нуклеотидов, модификация которых может быть выполнена без существенного влияния на активность олигонуклеотида по ингибированию экспрессии гена. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид по настоящему изобретению представляет собой олигонуклеотид, в котором смысловая цепь содержит (*например*, на своем 3'-конце) структуру «стебель-петля», обозначенную как: S1-L-S2, в которой S1 комплементарна S2, и в которой L образует петлю между S1 и S2 длиной до около 10 нуклеотидов (*например*, длиной 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов). На Фиг. 3 изображен неограничивающий пример такого олигонуклеотида.

[00118] В некоторых вариантах осуществления петля (F) в структуре «стебель - петля» представляет собой тетрапетлю (*например*, в структуре тетрапетли с разрывом). Тетрапетля может содержать рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды и их комбинации. Обычно тетрапетля содержит от 4 до 5 нуклеотидов.

[00119] v. Модификации олигонуклеотидов

[00120] a. Модификации сахара

[00121] В некоторых вариантах осуществления модифицированный сахар (также называемый в данном документе аналогом сахара) включает модифицированный фрагмент дезоксирибозы или рибозы, в котором, например, одна или большее количество модификаций происходят в 2', 3', 4' и/или 5' углеродном положении сахара. В некоторых вариантах осуществления модифицированный сахар может также включать неприродные альтернативные углеродные структуры, такие как те, которые присутствуют в заблокированных нуклеиновых кислотах ("LNA"; см., *например*, Koshkin *et al.* (1998) *Tetrahedron* 54:3607-3630), разблокированных нуклеиновых кислотах ("UNA"; см., *например*, Snead *et al.* (2013) *Mol. Ther-Nucl. Acids* 2:e103), и мостиковых нуклеиновых кислотах ("BNA"; см., *например*, Imanishi & Obika (2002) *Chem Commun. (Camb)* 21:1653-1659).

[00122] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная модификация в сахаре содержит 2'-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 2'-модификация может представлять собой 2'-О-пропаргил, 2'-О-пропиламин, 2'-амино, 2'-этил, 2'-фтор (2'-F), 2'-аминоэтил (EA), 2'-О-метил (2'-OMe), 2'-О-метоксиэтил (2'-MOE), 2'-О-[2-(метиламино)-2-оксоэтил] (2'-O-NMA), или 2'-дезоксид-2'-фтор-β-d-арабинонуклеиновую кислоту (2'-FANA). В некоторых вариантах осуществления модификация представляет

собой 2'-F, 2'-OMe или 2'-MOE. В некоторых вариантах осуществления модификация сахара включает модификацию сахарного кольца, которая может содержать модификацию одного или большего количества атомов углерода сахарного кольца. Например, модификация сахара нуклеотида может включать 2'-кислород сахара, связанный с 1'-углеродом или 4'-углеродом сахара, или 2'-кислород связан с 1'-углеродом или 4'-углеродом *через* этиленовый или метиленовый мостик. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид содержит ациклический сахар, в котором отсутствует связь 2'-углерод-3'-углерод. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид содержит тиоловую группу, *например*, в 4'-положении сахара.

[00123] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, описанный в данном документе, содержит по меньшей мере около 1 модифицированного нуклеотида (*например*, по меньшей мере 1, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60 и более). В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь олигонуклеотида содержит по меньшей мере около 1 модифицированного нуклеотида (*например*, по меньшей мере 1, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35 или более). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь олигонуклеотида содержит по меньшей мере около 1 модифицированного нуклеотида (*например*, по меньшей мере 1, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или более).

[00124] В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды смысловой цепи олигонуклеотида являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды антисмысловой цепи олигонуклеотида являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления модифицированы все нуклеотиды олигонуклеотида (*т.е.* как смысловая, так и антисмысловая цепь). В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид содержит 2'-модификацию (*например*, 2'-F или 2'-OMe, 2'-MOE и 2'-дезоксид-2'-фтор-β-d-арабинонуклеиновую кислоту). В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид содержит 2'-модификацию (*например*, 2'-F или 2'-OMe).

[00125] В настоящем изобретении предлагаются олигонуклеотиды, имеющие различные модели модификации. В некоторых вариантах осуществления модифицированные олигонуклеотиды содержат последовательность смысловой цепи, имеющую профиль модификации, указанный в любой из **Таблиц 3 и 4** (а также на Фиг. 3), и антисмысловой цепи, имеющую профиль модификации, указанный в любой из **Таблиц 3 и 4** (а также на Фиг. 3). В некоторых вариантах осуществления для этих олигонуклеотидов одно или большее количество положений 8, 9, 10 или 11 смысловой цепи модифицированы группой 2'-F. В других вариантах осуществления для этих олигонуклеотидов сахарный фрагмент в каждом из нуклеотидов в положениях 1-7 и 12-20 в смысловой цепи модифицирован группой 2'-OMe.

[00126] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается олигонуклеотид, который представляет собой или содержит модифицированную или немодифицированную смысловую цепь, выбранную из перечисленных в Таблице А. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается олигонуклеотид, который представляет собой или содержит модифицированную или немодифицированную антисмысловую цепь, выбранную из перечисленных в Таблице А. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается модифицированный или немодифицированный двухцепочечный олигонуклеотид, выбранный из перечисленных в Таблице А. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается профиль модификации смысловой цепи, выбранный из перечисленных в Таблице А. В некоторых вариантах осуществления

настоящего изобретения предлагается профиль модификации антисмысловой цепи, выбранный из перечисленных в Таблице А.

[00127] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит 3 нуклеотида, которые модифицированы в 2'-положении сахарного фрагмента группой 2'-F. В некоторых вариантах осуществления сахарный фрагмент в положениях 2, 5 и 14 и необязательно до 3 нуклеотидов в положениях 1, 3, 7 и 10 антисмысловой цепи модифицированы группой 2'-F. В некоторых вариантах осуществления сахарный фрагмент в каждом из положений в положениях 2, 5 и 14 антисмысловой цепи модифицирован группой 2'-F. В некоторых вариантах осуществления сахарный фрагмент в каждом из положений в положениях 1, 2, 5 и 14 антисмысловой цепи модифицирован группой 2'-F. В других вариантах осуществления сахарный фрагмент в каждом из положений в положениях 1, 2, 3, 5, 7 и 14 антисмысловой цепи модифицирован группой 2'-F. В еще одном варианте осуществления сахарный фрагмент в каждом из положений в положениях 1, 2, 3, 5, 10 и 14 антисмысловой цепи модифицирован группой 2'-F. В другом варианте осуществления сахарный фрагмент в каждом из положений в положениях 2, 3, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой цепи модифицирован группой 2'-F.

[00128] b. 5'-концевые фосфаты

[00129] В некоторых вариантах осуществления 5'-концевые фосфатные группы олигонуклеотидов усиливают взаимодействие с Ago2. Однако олигонуклеотиды, содержащие 5'-фосфатную группу, могут подвергаться деградации *под действием* фосфатаз или других ферментов, что может ограничивать их биодоступность *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды включают аналоги 5'-фосфатов, устойчивые к такой деградации. В некоторых вариантах осуществления аналог фосфата может представлять собой оксиметилфосфонат, винилфосфонат или малонилфосфонат. В определенных вариантах осуществления 1'-конец олигонуклеотидной цепи присоединен к химическому фрагменту, который имитирует электростатические и стерические свойства природной 5'-фосфатной группы («имитатор фосфата»).

[00130] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет фосфатный аналог в 4'-углеродном положении сахара (называемый «4'-фосфатным аналогом»). *См., например,* Международную публикацию заявки на патент № WO 2018/045317. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, содержит 4'-фосфатный аналог на 5'-концевом нуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления фосфатный аналог является оксиметилфосфонатом, в котором атом кислорода оксиметильной группы связан с сахарным фрагментом (*например,* с его 4'-углеродом) или его аналогом. В других вариантах осуществления аналог 4'-фосфата является тиометилфосфонатом или аминотетилфосфонатом, в которых атом серы тиометильной группы или атом азота аминотетильной группы связан с 4'-углеродом сахарного фрагмента или его аналогом. В определенных вариантах осуществления аналог 4'-фосфата представляет собой оксиметилфосфонат. В некоторых вариантах осуществления оксиметилфосфонат представлен формулой  $-O-CH_2-PO(OH)_2$  или  $-O-CH_2-PO(OR)_2$ , где R независимо выбран из H, CH<sub>3</sub>, алкильной группы, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, CH<sub>2</sub>OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> или защитной группы. В определенных вариантах осуществления алкильная группа представляет собой CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. В более типовых вариантах R независимо выбран из H, CH<sub>3</sub> или CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

[00131] c. Модифицированные внутринуклеозидные связи

[00132] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать модифицированную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах осуществления фосфатные модификации или замены могут способствовать получению олигонуклеотида, который содержит по меньшей мере около 1 (*например,* по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3 или по меньшей мере 5) модифицированную

межнуклеотидную связь. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе олигонуклеотидов содержит от около 1 до около 10 (*например*, от 1 до 10, от 2 до 8, от 4 до 6, от 3 до 10, от 5 до 10, от 1 до 5, от 1 до 3 или от 1 до 2) модифицированных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе олигонуклеотидов содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 модифицированных межнуклеотидных связей.

[00133] Модифицированная межнуклеотидная связь может представлять собой фосфоротиоатную связь, фосфоротиоатную связь, фосфотриэфирную связь, тиоалкилфосфонатную связь, тиоалкилфосфотриэфирную связь, фосфорамидитную связь, фосфонатную связь или боранофосфатную связь. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна модифицированная межнуклеотидная связь любого из олигонуклеотидов, описанных в данном документе, представляет собой фосфоротиоатную связь.

[00134] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, описанный в данном документе, имеет фосфоротиоатную связь между одним или большим количеством из следующих элементов: положения 1 и 2 смысловой цепи, положения 1 и 2 антисмысловой цепи, положения 2 и 3 антисмысловой цепи, положения 3 и 4 антисмысловой цепи, положения 20 и 21 антисмысловой цепи и положения 21 и 22 антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, описанный в данном документе, имеет фосфоротиоатную связь между каждым из следующих элементов: положения 1 и 2 смысловой цепи, положения 1 и 2 антисмысловой цепи, положения 2 и 3 антисмысловой цепи, положения 20 и 21 антисмысловой цепи и положения 21 и 22 антисмысловой цепи.

[00135] d. Модификации оснований

[00136] В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды, описанные в данном документе, содержат одно или большее количество модифицированных нуклеоснований. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеоснования (также называемые в данном документе аналогами оснований) связаны в 1'-положении сахарного фрагмента нуклеотида. В определенных вариантах осуществления изобретения модифицированное нуклеоснование представляет собой азотистое основание. В определенных вариантах осуществления изобретения модифицированное нуклеоснование не содержит атома азота. *См., например*, публикацию заявки на патент США № 2008/0274462. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид содержит универсальное основание. Однако в определенных вариантах осуществления модифицированный нуклеотид не содержит азотистого основания (абазический).

[00137] В некоторых вариантах осуществления универсальное основание представляет собой гетероциклический фрагмент, расположенный в 1'-положении сахарного фрагмента нуклеотида в модифицированном нуклеотиде, или в эквивалентном положении в замене сахарного фрагмента нуклеотида, который, если он присутствует в дуплексе, может быть расположен напротив более чем одного типа основания без существенного изменения структуры дуплекса. В некоторых вариантах осуществления, по сравнению с эталонной одноцепочечной нуклеиновой кислотой (*например*, олигонуклеотидом), которая полностью комплементарна целевой нуклеиновой кислоте, одноцепочечная нуклеиновая кислота, содержащая универсальное основание, образует дуплекс с целевой нуклеиновой кислотой, которая имеет более низкое значение  $T_m$ , чем дуплекс, образованный комплементарной нуклеиновой кислотой. Однако в некоторых вариантах осуществления, по сравнению с эталонной одноцепочечной нуклеиновой кислотой, в которой универсальное основание было заменено на основание, создающее одно несоответствие, одноцепочечная нуклеиновая кислота, содержащая универсальное основание, образует дуплекс с целевой

нуклеиновой кислотой, который имеет более высокий показатель  $T_m$ , чем дуплекс, образованный с нуклеиновой кислотой, содержащей несоответствующее основание.

[00138] Неограничивающие примеры нуклеотидов с универсальным связыванием включают, помимо прочего, инозин, 1- $\beta$ -D-рибофуранозил-5-нитроиндол и/или 1- $\beta$ -D-рибофуранозил-3-нитропиррол (см. Публикацию заявки на патент США № 2007/0254362; Van Aerschot *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:4363-4370; Loakes *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:2361-2366; and Loakes & Brown (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4039-4043).

[00139] е. Обратимые модификации

[00140] Хотя могут быть сделаны определенные модификации для защиты олигонуклеотида от окружающей среды *in vivo* до того, как он достигнет целевых клеток, указанные модификации могут снизить эффективность или активность олигонуклеотида после того, как он достигнет цитозоля целевой клетки. Могут быть осуществлены обратимые модификации, так что молекула сохраняет желаемые свойства вне клетки, которые затем удаляются при попадании в цитозольное окружение клетки. Обратимую модификацию можно устранить, например, действием внутриклеточного фермента или химическими условиями внутри клетки (*например*, путем восстановления внутриклеточным глутатионом).

[00141] В некоторых вариантах осуществления обратимо модифицированный нуклеотид содержит чувствительный к глутатиону фрагмент. Как правило, молекулы нуклеиновых кислот химически модифицируют фрагментами циклического дисульфида, чтобы замаскировать отрицательный заряд, создаваемый межнуклеотидными дифосфатными связями, и улучшить поглощение клетками и устойчивость к нуклеазам. См. публикацию заявки на патент США № 2011/0294869, Международную публикацию заявки на патенты №№ WO 2014/088920 и WO 2015/188197 и Meade *et al.* (2014) *Nat. Biotechnol.* 32:1256-1263.. Эта обратимая модификация межнуклеотидных дифосфатных связей предназначена для внутриклеточного расщепления восстановительной средой цитозоля (*например*, глутатионом). Более ранние примеры включают нейтрализацию модификаций фосфотриэфира, которые, как сообщалось, расщепляются внутри клеток (см., Dellinger *et al.* (2003) *J. Am. Chem. Soc.* 125:940-950).

[00142] В некоторых вариантах осуществления такая обратимая модификация обеспечивает защиту во время введения *in vivo* (*например*, при прохождении через кровь и/или лизосомальные/эндосомальные компартменты клетки), когда олигонуклеотид будет подвергаться воздействию нуклеаз и других неблагоприятных условий окружающей среды (*например*, pH). При высвобождении в цитозоль клетки, где уровень глутатиона выше по сравнению с внеклеточным пространством, происходит обратная модификация, и в результате образуется расщепленный олигонуклеотид. Используя обратимые, чувствительные к глутатиону фрагменты, можно ввести стерически более крупные химические группы в представляющий интерес олигонуклеотид по сравнению с вариантами, доступными с использованием необратимых химических модификаций. Это связано с тем, что эти более крупные химические группы будут удалены в цитозоле и, следовательно, не должны препятствовать биологической активности олигонуклеотидов внутри цитозоля клетки. В результате эти более крупные химические группы могут быть сконструированы для придания нуклеотиду или олигонуклеотиду различных преимуществ, таких как устойчивость к нуклеазам, липофильность, заряд, термостабильность, специфичность и сниженная иммуногенность. В некоторых вариантах осуществления структура чувствительного к глутатиону фрагмента может быть сконструирована таким образом, чтобы изменить кинетику его высвобождения.

[00143] В некоторых вариантах осуществления чувствительный к глутатиону фрагмент присоединен к сахару нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления чувствительный к глутатиону фрагмент

присоединен к 2'-углероду сахара модифицированного нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления чувствительный к глутатиону фрагмент расположен на 5'-углероде сахара, особенно когда модифицированный нуклеотид представляет собой 5'-концевой нуклеотид олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления чувствительный к глутатиону фрагмент расположен на 3'-углероде сахара, особенно когда модифицированный нуклеотид представляет собой 3'-концевой нуклеотид олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления чувствительный к глутатиону фрагмент содержит сульфонильную группу. См., например, Предварительную заявку на патент США № 62/378 635, озаглавленную «Композиции, содержащие обратимо модифицированные олигонуклеотиды, и их применение», которая была подана 23 августа 2016 г.

[00144] vi. Нацеливающиеся лиганды

[00145] В некоторых вариантах осуществления желательно нацеливать олигонуклеотиды по настоящему изобретению на одну или большее количество клеток или один или большее количество органов. Такая стратегия может помочь избежать нежелательных эффектов в других органах или избежать чрезмерной потери олигонуклеотида в клетках, тканях или органах, которые не получают пользы от олигонуклеотида. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления описанные олигонуклеотиды модифицированы для облегчения нацеливания и/или доставки в конкретную ткань, клетку или орган (например, для облегчения доставки олигонуклеотида в печень). В определенных вариантах осуществления описанные олигонуклеотиды модифицированы для облегчения доставки олигонуклеотида в гепатоциты печени. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере один нуклеотид (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более нуклеотидов), конъюгированный с одним или большим количеством нацеливающихся лигандов.

[00146] В некоторых вариантах осуществления нацеливающийся лиганд содержит углевод, аминсахар, холестерин, пептид, полипептид, белок или часть белка (например, , антитело или фрагмент антитела) или липид. В некоторых вариантах осуществления нацеливающийся лиганд представляет собой аптамер. Например, нацеливающимся лигандом может быть пептид RGD, который применяется для нацеливания на сосудистую сеть опухоли или клетки глиомы, пептид CREKA для нацеливания на сосудистую сеть опухоли или стомы, трансферрин, лактоферрин или аптамер для нацеливания на рецепторы трансферрина, экспрессированные в сосудистой сети CNS, или антитело анти-EGFR для нацеливания на EGFR на клетках глиомы. В определенных вариантах осуществления нацеливающийся лиганд представляет собой одну или большее количество фрагментов GalNAc.

[00147] В некоторых вариантах осуществления каждый из 1 или большего количества (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) нуклеотидов олигонуклеотида конъюгирован с отдельным нацеливающимся лигандом. В некоторых вариантах осуществления каждый из 2-4 нуклеотидов олигонуклеотида конъюгирован с отдельным нацеливающимся лигандом. В некоторых вариантах осуществления нацеливающиеся лиганды конъюгированы с 2-4 нуклеотидами на любом конце смысловой или антисмысловой цепи (например, нацеливающиеся лиганды конъюгированы с липким концом 2-4 нуклеотидов или удлинением на 5'- или 3'-конце смысловой или антисмысловой цепи), так что нацеливающиеся лиганды напоминают щетинки зубной щетки, а сам олигонуклеотид напоминает зубную щетку. Например, олигонуклеотид может содержать структуру «стебель-петля» либо на 5'-, либо на 3'-конце смысловой цепи, и 1, 2, 3 или 4 нуклеотида петли стебля могут быть индивидуально конъюгированы с нацеливающимся лигандом. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид (например, , ds олигонуклеотид), описанный в настоящем документе, содержит структуру «стебель-петля» на 3'-конце смысловой цепи, при этом петля структуры «стебель-петля»

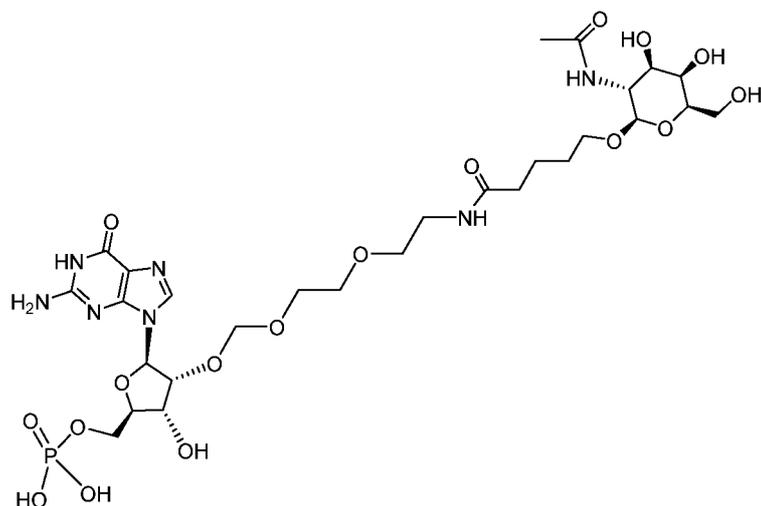
содержит трипетлю или тетрапетлю, и при этом 3 или 4 нуклеотида, составляющие соответственно трипетлю или тетрапетлю, индивидуально конъюгированы с нацеливающимся лигандом.

[00148] GalNAc является лигандом с высокой аффинностью к ASGPR, который в первую очередь экспрессируется на синусоидальной поверхности клеток-гепатоцитов и играет важную роль в связывании, интернализации и последующем удалении циркулирующих гликопротеинов, содержащих концевые остатки галактозы или GalNAc (асialogликопротеины). Конъюгация (опосредованная или прямая) фрагментов GalNAc с олигонуклеотидами по настоящему изобретению может применяться для нацеливания олигонуклеотидов на ASGPR, экспрессируемый на клетках. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид по настоящему изобретению конъюгирован по меньшей мере с одним или большим количеством фрагментов GalNAc, при этом фрагменты GalNAc нацеливают олигонуклеотид на ASGPR, экспрессируемый на клетках печени человека (*например*, гепатоцитах человека). В некоторых вариантах осуществления фрагмент GalNAc нацеливает олигонуклеотид на печень.

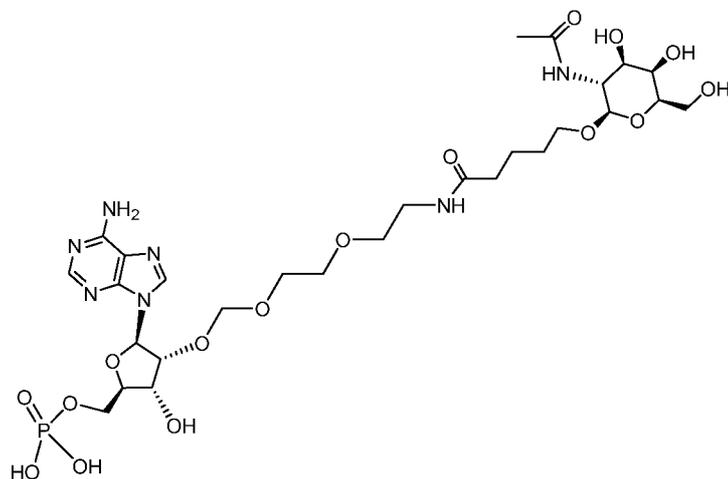
[00149] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид по настоящему изобретению конъюгирован прямо или опосредованно с моновалентным GalNAc. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид конъюгирован прямо или опосредованно одним или большим количеством одновалентных GalNAc (*т.е.* конъюгирован с 2, 3 или 4 одновалентными фрагментами GalNAc и обычно конъюгирован с 3 или 4 одновалентными фрагментами GalNAc). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид конъюгирован с одним или большим количеством двухвалентных фрагментов GalNAc, трехвалентных фрагментов GalNAc или четырехвалентных фрагментов GalNAc.

[00150] В некоторых вариантах осуществления каждый из 1 или большего количества (*например*, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) нуклеотидов олигонуклеотида конъюгирован с фрагментом GalNAc. В некоторых вариантах осуществления от 2 до 4 нуклеотидов тетрапетли конъюгированы с отдельным GalNAc. В некоторых вариантах осуществления от 1 до 3 нуклеотидов трипетли конъюгированы с отдельным GalNAc. В некоторых вариантах осуществления нацеливающиеся лиганды конъюгированы с 2-4 нуклеотидами на любом конце смысловой или антисмысловой цепи (*например*, лиганды конъюгированы с липким концом 2-4 нуклеотидов или удлинением на 5'- или 3'-конце смысловой или антисмысловой цепи), так что фрагменты GalNAc напоминают щетинки зубной щетки, а сам олигонуклеотид напоминает зубную щетку. В некоторых вариантах осуществления фрагменты GalNAc конъюгированы с нуклеотидом смысловой цепи. Например, 4 фрагменты GalNAc могут быть конъюгированы с нуклеотидами в тетрапетле смысловой цепи, при этом каждый фрагмент GalNAc конъюгирован с 1 нуклеотидом.

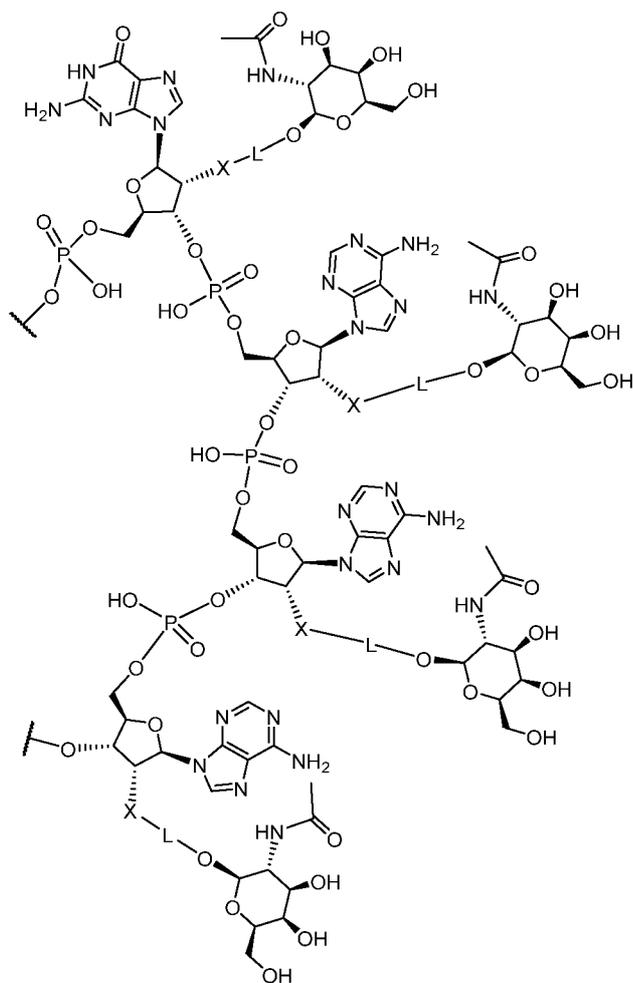
[00151] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, описанный в данном документе, содержит моновалентный GalNAc, присоединенный к гуаниновому нуклеотиду, и обозначается как [ademG-GalNAc] или 2'-аминодиэтоксиметанол-гуанин-GalNAc, как продемонстрировано ниже.



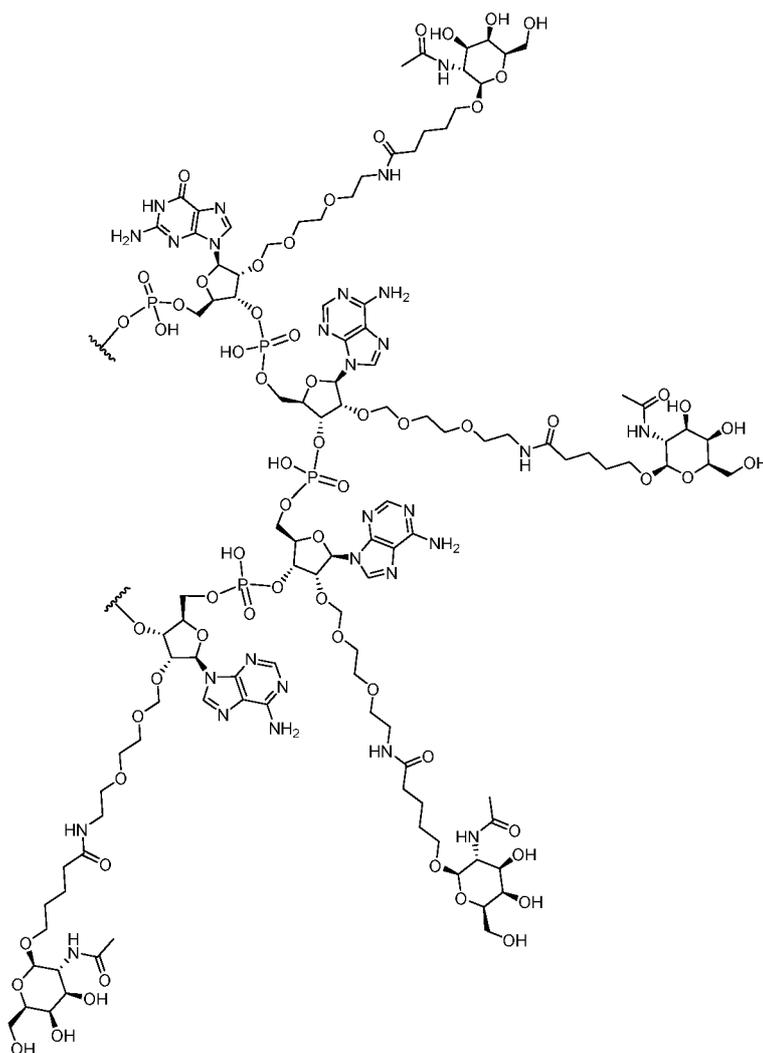
[00152] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, описанный в данном документе, содержит моновалентный GalNAc, присоединенный к адениновому нуклеотиду, и обозначается как [ademA-GalNAc] или 2'-аминодиэтоксиметанол-аденин-GalNAc, как продемонстрировано ниже.



[00153] Пример такой конъюгации продемонстрирован ниже для петли, содержащей от 5' до 3' нуклеотидную последовательность GAAA (L = линкер, X = гетероатом), продемонстрированы также точки присоединения стебля. Такая петля может присутствовать, например, в положениях 27-30 смысловой цепи, перечисленных в Таблице 5 и как продемонстрировано на Фиг. 3. В химической формуле, ~~3~~ используется для описания точки присоединения к цепи олигонуклеотида.



[00154] Соответствующие способы или химия (например, клик-химия) могут применяться для связывания нацеливающегося лиганда с нуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления нацеливающийся лиганд конъюгирован с нуклеотидом с применением клик-линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер на основе ацетала применяется для конъюгации нацеливающегося лиганда с нуклеотидом любого из олигонуклеотидов, описанных в данном документе. Линкеры на основе ацетала описаны, например, в Международной публикации заявки на патент № WO 2016/100401. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой лабильный линкер. Однако в других вариантах осуществления линкер является стабильным. Ниже приведен пример для петли, содержащей от 5' до 3' нуклеотиды GAAA, в которой фрагменты GalNAc присоединены к нуклеотидам петли с помощью ацетального линкера. Такая петля может присутствовать, например, в положениях 27-30 любой из смысловых цепей, перечисленных в **Таблице 5** и как продемонстрировано на **Фиг. 3**. В химической формуле,  используется для описания точки присоединения к цепи олигонуклеотида.



[00155] Как уже упоминалось, различные подходящие способы или методики химического синтеза (*например*, клик-химия) могут применяться для связывания нацеливающегося лиганда с нуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления нацеливающийся лиганд конъюгирован с нуклеотидом с применением клик-линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер на основе ацетала применяется для конъюгации нацеливающегося лиганда с нуклеотидом любого из олигонуклеотидов, описанных в данном документе. Линкеры на основе ацетала описаны, например, в Международной публикации заявки на патент № WO 2016/100401. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой лабильный линкер. Однако в других вариантах осуществления линкер является стабильным.

[00156] В некоторых вариантах осуществления дуплексное удлинение (*например*, длиной до 3, 4, 5 или 6 bp) предлагается между нацеливающимся лигандом (*например*, фрагментом GalNAc) и ds олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по настоящему изобретению не имеют конъюгированного с ними GalNAc.

### [00157] III. Составы

[00158] Для облегчения применения олигонуклеотидов были разработаны различные составы. Например, олигонуклеотиды могут быть доставлены субъекту или клеточной среде с применением состава, который сводит к минимуму деградацию, облегчает доставку и/или поглощение или придает олигонуклеотидам в составе другое полезное свойство. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид составляют в

буферных растворах, таких как фосфатно-солевые растворы, липосомы, мицеллярные структуры и капсиды.

[00159] Составы олигонуклеотидов с катионными липидами можно применять для облегчения трансфекции олигонуклеотидов в клетки. Например, можно применять катионные липиды, такие как липофектин, катионные производные глицерина и поликатионные молекулы (*например*, полилизин). Пригодные липиды включают олигофектамин, липофектамин (Life Technologies), NC388 (Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., Боулдер, штат Колорадо) или FuGene 6 (Roche), все из которых можно применять в соответствии с инструкциями производителя.

[00160] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления состав содержит липидную наночастицу. В некоторых вариантах осуществления эксципиент содержит липосому, липид, липидный комплекс, микросферу, микрочастицу, наносферу или наночастицу или может быть приготовлен иным образом для введения в клетки, ткани, органы или организм субъекта, имеющего потребность в этом (*см.*, *например*, Remington: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, 22nd edition, Pharmaceutical Press, 2013).

[00161] В некоторых вариантах осуществления составы по настоящему изобретению содержат эксципиент. В некоторых вариантах осуществления эксципиент придает композиции улучшенную стабильность, улучшенную абсорбцию, улучшенную растворимость и/или терапевтическое усиление активного ингредиента. В некоторых вариантах осуществления эксципиент представляет собой буферный агент (*например*, цитрат натрия, фосфат натрия, трис-основание или гидроксид натрия) или носитель (*например*, буферный раствор, вазелин, диметилсульфоксид или минеральное масло). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид лиофилизируют для продления срока его хранения, а затем переводят в раствор перед применением (*например*, введением субъекту). Соответственно, эксципиент в композиции, содержащей любой из олигонуклеотидов, описанных в настоящем документе, может представлять собой лиопротектор (*например*, маннит, лактозу, полиэтиленгликоль или поливинилпирролидон) или модификатор температуры разрушения (*например*, декстран, Ficoll™ или желатин).

[00162] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция составлена так, чтобы быть совместимой с предполагаемым путем ее введения. Примеры путей введения включают парентеральное, (*например*, внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное, интрадермальное, подкожное), пероральное (*например*, ингаляционное), трансдермальное (*например*, местное), трансмукозальное и ректальное введение.

[00163] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекции, включают стерильные водные растворы (в случае растворимости в воде) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий для немедленного приема. Для внутривенного введения подходящие носители включают в себя физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, StemoPhor EL™ (BASF, Парсиппани, штат Нью-Джерси) или фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, которые содержат, например, воду, этанол, полиол (*например*, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и т. п.) и их подходящие смеси. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения олигонуклеотидов в требуемом количестве в выбранном растворителе с одним или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием.

[00164] В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать по меньшей мере около 0,1% терапевтического агента или более, хотя процентное содержание активного ингредиента(ов) может составлять от около 1% до около 80% или более от веса или объема всей композиции. Такие факторы, как

растворимость, биодоступность, биологический период полувыведения, способ введения, срок годности продукта, а также другие фармакологические особенности, будут учтены специалистом в данной области техники при приготовлении таких фармацевтических составов, и поэтому могут быть желательны различные дозы и схемы лечения.

[00165] Несмотря на то, что несколько вариантов осуществления направлены на целевую доставку в печень любого из описанных в данном документе олигонуклеотидов, также рассматривается нацеливание на другие ткани.

[00166] IV. Способы применения

[00167] i. Снижение экспрессии ANGPTL3 в клетке.

[00168] В настоящем изобретении предлагаются способы приведения в контакт или доставки в клетку или популяцию клеток эффективного количества любого из олигонуклеотидов, описанных в данном документе, для снижения экспрессии ANGPTL3. Предлагаемые способы могут включать этапы, описанные в данном документе, и они могут, но не обязательно, выполняться в описанной последовательности. Однако возможны и другие последовательности. Кроме того, отдельные или множество этапов могут выполняться либо параллельно, и/или с перекрытием во времени, и/или индивидуально, либо многократно повторяющимися этапами. Кроме того, предлагаемые способы могут включать дополнительные, неуказанные этапы.

[00169] Предлагаемые в данном документе способы применимы в любом подходящем типе клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой любую клетку, которая экспрессирует мРНК (*например*, гепатоциты, макрофаги, клетки, полученные из моноцитов, клетки рака предстательной железы, клетки головного мозга, эндокринной ткани, костного мозга, лимфатических узлов, легких, желчного пузыря, печени, двенадцатиперстной кишки, тонкого кишечника, поджелудочной железы, почек, желудочно-кишечного тракта, мочевого пузыря, жировой и мягкой ткани, а также кожи). В некоторых вариантах осуществления указанная клетка представляет собой первичную клетку, полученную от субъекта. В некоторых вариантах осуществления указанная первичная клетка подвергалась ограниченному количеству пассажей, так что клетка по существу сохраняет свои естественные фенотипические свойства. В некоторых вариантах осуществления клетка, в которую доставляется олигонуклеотид, находится *ex vivo* или *in vitro* (*м.е.*, олигонуклеотид может быть доставлен в клетку в культуре или в организм, в котором находится клетка).

[00170] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по настоящему изобретению доставляют с помощью соответствующих способов доставки нуклеиновых кислот, включая, помимо прочего, инъекцию раствора, содержащего олигонуклеотиды, бомбардировку частицами, покрытыми олигонуклеотидами, воздействие на клетку или популяцию клеток раствором, содержащим олигонуклеотиды, или электропорацию клеточных мембран в присутствии олигонуклеотидов. Можно применять и другие подходящие способы доставки олигонуклеотидов в клетки, такие как липидопосредованный транспорт носителя, химически опосредованный транспорт и трансфекция катионными липосомами, такими как фосфат кальция, и другие.

[00171] В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии ANGPTL3 можно определить с помощью соответствующего анализа или методики для оценки одного или большего количества свойств или характеристик клетки или популяции клеток, ассоциированных с экспрессией ANGPTL3 (*например*, с применением биомаркера экспрессии ANGPTL3), или с помощью анализа или методики, которая оценивает молекулы, которые непосредственно указывают на экспрессию ANGPTL3 (*например*, мРНК ANGPTL3 или белок ANGPTL3). В некоторых вариантах осуществления степень, в которой олигонуклеотид по настоящему изобретению снижает экспрессию ANGPTL3, оценивают путем сравнения экспрессии ANGPTL3 в клетке или

популяции клеток, контактировавших с олигонуклеотидом, с соответствующим контролем (*например*, соответствующей клеткой или популяцией клеток, не контактировавшей с олигонуклеотидом или контактировавшей с контрольным олигонуклеотидом). В некоторых вариантах осуществления соответствующий контрольный уровень экспрессии мРНК в белок после доставки молекулы РНКi может представлять собой заранее определенный уровень или значение, так что нет необходимости каждый раз измерять контрольный уровень. Предопределенный уровень или значение могут принимать различные формы. В некоторых вариантах осуществления заранее определенный уровень или значение может быть единственным пороговым значением, таким как медиана или среднее значение.

[00172] В некоторых вариантах осуществления введение олигонуклеотида, описанного в данном документе, приводит к снижению экспрессии ANGPTL3 в клетке или популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии ANGPTL3 составляет около 1 % или ниже, около 5 % или ниже, около 10 % или ниже, около 15 % или ниже, около 20 % или ниже, около 25 % или ниже, около 30 % или ниже, около 35 % или ниже, около 40% или ниже, около 45% или ниже, около 50% или ниже, около 55% или ниже, около 60% или ниже, около 70% или ниже, около 80% или ниже или около 90% или ниже по сравнению с соответствующим контрольным уровнем мРНК. Соответствующий контрольный уровень может представлять собой уровень экспрессии мРНК и/или трансляции белка в клетке или популяции клеток, которые не контактировали с олигонуклеотидом по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления эффект доставки олигонуклеотида в клетку в соответствии со способом, описанным в данном документе, оценивают по истечении определенного периода времени. Например, уровни мРНК можно анализировать в клетке по меньшей мере через около 8 часов, через около 12 часов, через около 18 часов или через около 24 часа; или по меньшей мере через около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или даже до 14 дней после введения олигонуклеотида в клетку.

[00173] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид доставляется в форме трансгена, сконструированного для экспрессии в клетке олигонуклеотида, или цепей, содержащих олигонуклеотид (*например*, его смысловой и антисмысловой цепей). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид доставляется с помощью трансгена, сконструированного для экспрессии любого описанного в данном документе олигонуклеотида. Трансгены могут быть доставлены с помощью вирусных векторов (*например*, аденовируса, ретровируса, вируса осповакцины, поксвируса, аденоассоциированного вируса или вируса простого герпеса) или невирусных векторов (*например*, плазмид или синтетических мРНК). В некоторых вариантах осуществления трансгены можно вводить непосредственно субъекту.

[00174] ii. Медицинское применение

[00175] В настоящем изобретении предлагаются олигонуклеотиды для применения или адаптированные для применения для лечения субъекта (*например*, человека, страдающего заболеванием, нарушением или патологическим состоянием, ассоциированным с экспрессией ANGPTL3), для которого было бы полезно снижение экспрессии ANGPTL3. В некоторых отношениях, в настоящем изобретении предлагаются олигонуклеотиды для применения или адаптированные для применения для лечения субъекта, страдающего заболеванием, нарушением или патологическим состоянием, ассоциированным с экспрессией ANGPTL3. В настоящем изобретении также предлагаются олигонуклеотиды для применения или адаптации для применения при изготовлении лекарственного средства или фармацевтической композиции для лечения заболевания, нарушения или патологического состояния, ассоциированного с экспрессией ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды для применения, или адаптируемые для применения, нацелены на мРНК ANGPTL3 и снижают экспрессию ANGPTL3 (*например*, посредством пути РНКi). В

некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды для применения, или адаптируемые для применения, нацелены на мРНК ANGPTL3 и снижают количество или уровень мРНК ANGPTL3, белка ANGPTL3 и/или активности ANGPTL3.

[00176] Кроме того, описанные ниже способы могут включать выбор субъекта, имеющего заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, или предрасположенного к возникновению такового. В некоторых случаях описанные способы могут включать выбор индивидуума, имеющего маркер экспрессии ANGPTL3, такой как повышенный уровень TG или холестерина (или даже измененную активность LPL и/или EL), или предрасположенного к возникновению такового.

[00177] Аналогичным образом и как подробно описано ниже, указанные способы также могут включать такие этапы, как измерение или получение исходного значения для маркера экспрессии ANGPTL3, а затем сравнение такого полученного значения с одним или большим количеством других исходных значений или значений, полученных после введения олигонуклеотида для оценки эффективности лечения.

[00178] iii. Способы лечения

[00179] В настоящем изобретении также предлагаются способы лечения субъекта, страдающего, подозреваемого в наличии или подверженного риску развития заболевания, нарушения или патологического состояния, с применением олигонуклеотидов, описанных в данном документе. В некоторых аспектах, в настоящем изобретении предлагаются способы лечения или ослабления начала или прогрессирования заболевания, нарушения или патологического состояния, ассоциированного с экспрессией ANGPTL3, с применением олигонуклеотидов, описанных в данном документе. В некоторых аспектах, в настоящем изобретении предлагаются способы достижения одного или большего количества терапевтических преимуществ у субъекта, имеющего заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, с применением олигонуклеотидов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления предлагаемых способов субъекта лечат путем введения терапевтически эффективного количества любого одного или большего количества олигонуклеотидов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления лечение включает снижение экспрессии ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления субъекта лечат терапевтически. В некоторых вариантах осуществления субъекта лечат профилактически.

[00180] В некоторых вариантах осуществления предлагаемых способов олигонуклеотид или фармацевтическую композицию, содержащую олигонуклеотид, вводят субъекту, страдающему заболеванием, нарушением или патологическим состоянием, ассоциированным с экспрессией ANGPTL3, таким образом, что экспрессия ANGPTL3 у субъекта снижается, тем самым осуществляя лечение субъекта. В некоторых вариантах осуществления у субъекта снижено количество или уровень мРНК ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления у субъекта снижается количество или уровень белка ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления у субъекта снижается количество или уровень активности ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления у субъекта снижается количество или уровень триглицеридов (TG) (*например*, один или большее количество TG или общие TG). В некоторых вариантах осуществления у субъекта снижается количество или уровень холестерина (*например*, общий холестерин, холестерин LDL и/или холестерин HDL). В некоторых вариантах осуществления у субъекта снижается количество или уровень холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL). В некоторых вариантах осуществления у субъекта изменяется количество или активность LPL. В некоторых вариантах осуществления у субъекта изменяется количество или активность EL. В некоторых вариантах осуществления у субъекта снижена или изменена любая

комбинация следующего: экспрессия ANGPTL3, количество или уровень мРНК ANGPTL3, количество или уровень белка ANGPTL3, количество или уровень активности ANGPTL3, количество или уровень TG, количество или уровень холестерина и/или количество или активность LPL и/или EL.

[00181] В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов олигонуклеотид или фармацевтическую композицию, содержащую указанный олигонуклеотид, вводят субъекту, имеющему заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, так что экспрессия ANGPTL3 снижается у субъекта по меньшей мере на около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или более 99% по сравнению с экспрессией ANGPTL3 до введения олигонуклеотида или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления экспрессия ANGPTL3 снижается у субъекта по меньшей мере на около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или более 99% по сравнению с экспрессией ANGPTL3 у субъекта (*например*, эталонного или контрольного субъекта), не получавшего олигонуклеотид или фармацевтическую композицию или получавшего контрольный олигонуклеотид, фармацевтическую композицию или лечение.

[00182] В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов олигонуклеотид или фармацевтическую композицию, содержащую олигонуклеотид, вводят субъекту, имеющему заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, так что количество или уровень мРНК ANGPTL3 снижается у субъекта по меньшей мере на около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или более 99% по сравнению с количеством или уровнем мРНК ANGPTL3 до введения олигонуклеотида или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления количество или уровень мРНК ANGPTL3 снижается у субъекта по меньшей мере на около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или более 99% по сравнению с количеством или уровнем мРНК ANGPTL3 у субъекта (*например*, эталонного или контрольного субъекта), не получавшего олигонуклеотид или фармацевтическую композицию или получавшего контрольный олигонуклеотид, фармацевтическую композицию или лечение.

[00183] В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов олигонуклеотид или фармацевтическую композицию, содержащую олигонуклеотид, вводят субъекту, имеющему заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, так что количество или уровень белка ANGPTL3 снижается у субъекта по меньшей мере на около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или более 99% по сравнению с количеством или уровнем белка ANGPTL3 до введения олигонуклеотида или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления количество или уровень белка ANGPTL3 снижается у субъекта по меньшей мере на около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или более 99% по сравнению с количеством или уровнем белка ANGPTL3 у субъекта (*например*, эталонного или контрольного субъекта), не получавшего олигонуклеотид или фармацевтическую композицию или получавшего контрольный олигонуклеотид, фармацевтическую композицию или лечение.

[00184] В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов олигонуклеотид

или фармацевтическая композиция, содержащая олигонуклеотид, вводится субъекту, имеющему заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с ANGPTL3, так что активность/экспрессия ANGPTL3 снижается у субъекта по меньшей мере на около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или более 99% по сравнению с количеством или уровнем активности ANGPTL3 до введения олигонуклеотида или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления количество или уровень активности ANGPTL3 снижается у субъекта по меньшей мере на около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или более 99% по сравнению с количеством или уровнем активности ANGPTL3 у субъекта (*например*, эталонного или контрольного субъекта), не получавшего олигонуклеотид или фармацевтическую композицию или получавшего контрольный олигонуклеотид, фармацевтическую композицию или лечение.

[00185] В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов олигонуклеотид или фармацевтическую композицию, содержащую олигонуклеотид, вводят субъекту, имеющему заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, так что количество или уровень TG (*например*, один или большее количество TG или общие TG) снижается у субъекта по меньшей мере на около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или более 99% по сравнению с количеством или уровнем TG до введения олигонуклеотида или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления количество или уровень TG снижается у субъекта по меньшей мере на около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или более 99% по сравнению с количеством или уровнем TG у субъекта (*например*, эталонного или контрольного субъекта), не получавшего олигонуклеотид или фармацевтическую композицию или получавшего контрольный олигонуклеотид, фармацевтическую композицию или лечение.

[00186] Как правило, нормальный или желательный диапазон уровня TG для человека составляет <150 мг/дл крови, при этом <100 мг/дл считается идеальным. В некоторых вариантах осуществления субъект, выбранный для лечения или получающий лечение, идентифицирован или определен как имеющий количество или уровень TG  $\geq 150$  мг/дл. В некоторых вариантах осуществления субъект, выбранный для лечения или получающий лечение, идентифицирован или определен как имеющий количество или уровень TG в диапазоне от 150 мг/дл до 199 мг/дл, что считается погранично высоким уровнем TG. В некоторых вариантах осуществления субъект, выбранный для лечения или получающий лечение, идентифицирован или определен как имеющий количество или уровень TG в диапазоне от 200 мг/дл до 499 мг/дл, что считается высоким уровнем TG. В некоторых вариантах осуществления субъект, выбранный для лечения или получающий лечение, идентифицирован или определен как имеющий количество или уровень TG в диапазоне 500 мг/дл или выше (*т.е.*  $\geq 500$  мг/дл), что считается очень высоким уровнем TG. В некоторых вариантах осуществления субъект, выбранный для лечения или получающий лечение, идентифицирован или определен как имеющий количество или уровень TG, который составляет  $\geq 150$  мг/дл,  $\geq 200$  мг/дл или  $\geq 500$  мг/дл. В некоторых вариантах осуществления субъект, выбранный для лечения или получающий лечение, идентифицирован или определен как имеющий количество или уровень TG, который составляет от 200 мг/дл до 499 мг/дл или 500 мг/дл или выше. В некоторых вариантах осуществления пациент, выбранный для лечения или получающий лечение, идентифицирован или определен как имеющий количество или уровень TG  $\geq 200$  мг/дл.

[00187] В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов олигонуклеотид или фармацевтическую композицию, содержащую олигонуклеотид, вводят субъекту, имеющему заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, так что количество или уровень холестерина (*например*, общий холестерин, холестерин LDL и/или холестерин HDL) снижается у субъекта по меньшей мере на около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или более 99% по сравнению с количеством или уровнем холестерина до введения олигонуклеотида или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления количество или уровень холестерина снижается у субъекта по меньшей мере на около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или более 99% по сравнению с количеством или уровнем холестерина у субъекта (*например*, эталонного или контрольного субъекта), не получавшего олигонуклеотид или фармацевтическую композицию или получавшего контрольный олигонуклеотид, фармацевтическую композицию или лечение.

[00188] Как правило, нормальный или желаемый уровень холестерина (общий холестерин) для взрослого человека составляет <200 мг/дл крови. В некоторых вариантах осуществления пациент, выбранный для лечения или получающий лечение, идентифицирован или определен как имеющий количество или уровень холестерина  $\geq 200$  мг/дл. В некоторых вариантах осуществления пациент, выбранный для лечения или получающий лечение, идентифицирован или определен как имеющий количество или уровень холестерина в диапазоне от 200 мг/дл до 239 мг/дл, что считается погранично высоким уровнем холестерина. В некоторых вариантах осуществления пациент, выбранный для лечения или получающий лечение, идентифицирован или определен как имеющий количество или уровень холестерина в диапазоне 240 мг/дл или выше (*m.e.*  $\geq 240$  мг/дл), что считается высоким уровнем холестерина. В некоторых вариантах осуществления пациент, выбранный для лечения или получающий лечение, идентифицирован или определен как имеющий количество или уровень холестерина, который составляет от 200 мг/дл до 239 мг/дл или 240 мг/дл или выше. В некоторых вариантах осуществления пациент, выбранный для лечения или получающий лечение, идентифицирован или определен как имеющий количество или уровень холестерина, который составляет  $\geq 200$  мг/дл или  $\geq 240$  мг/дл или выше.

[00189] В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов олигонуклеотид или фармацевтическую композицию, содержащую олигонуклеотид, вводят субъекту, имеющему заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, так что количество или уровень холестерина LDL снижается у субъекта по меньшей мере на около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или более 99% по сравнению с количеством или уровнем холестерина LDL до введения олигонуклеотида или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления количество или уровень холестерина LDL снижается у субъекта по меньшей мере на около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или более 99% по сравнению с количеством или уровнем холестерина LDL у субъекта (*например*, эталонного или контрольного субъекта), не получавшего олигонуклеотид или фармацевтическую композицию или получавшего контрольный олигонуклеотид, фармацевтическую композицию или лечение.

[00190] Как правило, нормальный или желаемый уровень холестерина LDL для взрослого человека составляет < 100 мг/дл крови. В некоторых вариантах осуществления субъект, выбранный для лечения или

получающий лечение, идентифицирован или определен как имеющий количество или уровень холестерина  $\geq 100$  мг/дл. В некоторых вариантах осуществления субъект, выбранный для лечения или получающий лечение, идентифицирован или определен как имеющий количество или уровень холестерина LDL в диапазоне от 100 мг/дл до 129 мг/дл, что считается выше оптимального. В некоторых вариантах осуществления субъект, выбранный для лечения или получающий лечение, идентифицирован или определен как имеющий количество или уровень холестерина LDL в диапазоне от 130 мг/дл до 159 мг/дл, что считается погранично высоким уровнем. В некоторых вариантах осуществления субъект, выбранный для лечения или получающий лечение, идентифицирован или определен как имеющий количество или уровень холестерина LDL в диапазоне от 160 мг/дл до 189 мг/дл, что считается высоким уровнем холестерина LDL. В некоторых вариантах осуществления субъект, выбранный для лечения или получающий лечение, идентифицирован или определен как имеющий количество или уровень холестерина LDL в диапазоне 190 мг/дл или выше (*m.e.*  $\geq 190$  мг/дл), что считается очень высоким уровнем холестерина. В некоторых вариантах осуществления субъект, выбранный для лечения или получающий лечение, идентифицирован или определен как имеющий количество или уровень холестерина LDL, который составляет  $\geq 100$  мг/дл,  $\geq 130$  мг/дл,  $\geq 160$  мг/дл или  $\geq 190$  мг/дл или выше, предпочтительно  $\geq 160$  мг/дл или  $\geq 190$  мг/дл или выше. В некоторых вариантах осуществления субъект, выбранный для лечения или получающий лечение, идентифицирован или определен как имеющий количество или уровень холестерина LDL от 100 мг/дл до 129 мг/дл, от 130 мг/дл до 159 мг/дл, от 160 мг/дл до 189 мг/дл или 190 мг/дл и выше.

[00191] В данной области техники известны пригодные способы определения экспрессии ANGPTL3, количества или уровня мРНК ANGPTL3, белка ANGPTL3, активности ANGPTL3, количества или активности TG и/или холестерина LDL, LPL и/или EL у субъекта или в образце, взятом у субъекта. Кроме того, приведенные в данном документе примеры иллюстрируют способы определения экспрессии ANGPTL3.

[00192] В некоторых вариантах осуществления в клетке (*например*, гепатоцит), популяции или группе клеток (*например*, органоид), органе (*например*, печень), крови или ее фракции (*например*, плазма), ткани (*например*, ткань печени), образце (*например*, образец биопсии печени) или любом другом подходящем биологическом материале, полученном или выделенном от субъекта, снижается экспрессия ANGPTL3, количество или уровень мРНК ANGPTL3, белка ANGPTL3, активности ANGPTL3, TG, холестерина LDL, белка LPL, активности LPL, белка EL, активности EL или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления экспрессия ANGPTL3, количество или уровень мРНК ANGPTL3, белок ANGPTL3, активность ANGPTL3, TG, холестерин LDL, белок LPL, активность LPL, белок EL, активность EL или любая их комбинация снижаются более чем в одном типе клеток (*например*, в гепатоците и в одном или большем количестве других типов клеток), более чем в одной группе клеток, более чем в одном органе (*например*, в печени и в одном или большем количестве других органов), более чем в одной фракции крови (*например*, в плазме и одной или большем количестве других фракций крови), более чем в одном типе ткани (*например*, в ткани печени и в одном или большем количестве других типов ткани), более чем в одном типе образца (*например*, в образце биопсии печени и в одном или большем количестве других типов образца биопсии), выделенных или других.

[00193] Примеры заболеваний, нарушений или патологических состояний, ассоциированных с экспрессией ANGPTL3, включают, помимо прочего, гипертриглицеридемию, ожирение, гиперлипидемию, нарушенный метаболизм липидов и/или холестерина, атеросклероз, сахарный диабет II типа (T2D), сердечно-сосудистые заболевания, хронические заболевания почек, ишемическую болезнь сердца, NASH, NAFLD, гомозиготную и гетерозиготную семейную гиперхолестеринемию, резистентную к статинам гиперхолестеринемию и другие

ассоциированные с ANGPTL3 метаболические нарушения и заболевания. Особый интерес в данном случае представляют сердечно-сосудистые заболевания, T2D, гипертриглицеридемия, NASH, ожирение или их комбинация.

[00194] Из-за своей высокой специфичности олигонуклеотиды по настоящему изобретению специфически нацелены на мРНК целевых генов-пораженных клеток и тканей. При профилактике заболевания целевым геном может быть ген, который необходим для возникновения или поддержания заболевания или который был идентифицирован как ассоциированный с повышенным риском заболевания. При лечении заболевания олигонуклеотид может быть введен в контакт с клетками или тканями, в которых проявляется патологический процесс. Например, олигонуклеотид, по существу идентичный всему или части гена дикого типа (*m.e.* нативного) или мутировавшего гена, ассоциированного с нарушением или патологическим состоянием, ассоциированным с экспрессией ANGPTL3, можно привести в контакт или ввести в клетку или тип ткани, представляющий интерес, например, гепатоцит или другую клетку печени.

[00195] В некоторых вариантах осуществления целевой ген может быть целевым геном любого млекопитающего, например, человека. Любой ген может быть заглушен в соответствии с описанным в данном документе способом.

[00196] Способы, описанные в данном документе, обычно включают введение субъекту эффективного количества олигонуклеотида, то есть количества, способного дать желаемый терапевтический результат. Терапевтически приемлемое количество может представлять количество, которое может терапевтически вылечить заболевание или нарушение. Пригодная доза для любого субъекта будет зависеть от определенных факторов, включая размер субъекта, площадь поверхности тела, возраст, конкретную вводимую композицию, активный ингредиент (ингредиенты) в композиции, время и способ введения, общее состояние здоровья, и другие препараты, применяемые одновременно.

[00197] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят любую из описанных в данном документе композиций либо энтерально (*например*, перорально, через гастральный зонд, через дуоденальный зонд, через гастростому или ректально), либо парентерально (*например*, подкожная инъекция, внутривенная инъекция или инфузия, внутриартериальная инъекция или инфузия, внутрикостная инфузия, внутримышечная инъекция, интрацеребральная инъекция, интрацеребровентрикулярная инъекция, интратекальная инъекция), местно (*например*, на кожу, ингаляционно, в глазных каплях или через слизистую оболочку) или путем прямой инъекции в целевой орган (*например*, печень субъекта). Обычно описанные олигонуклеотиды вводят внутривенно или подкожно.

[00198] В качестве неограничивающего набора примеров олигонуклеотиды по настоящему изобретению обычно вводят один раз в квартал (один раз в три месяца), каждые два месяца (один раз в два месяца), один раз в месяц или один раз в неделю. Например, олигонуклеотиды можно вводить каждую неделю или с интервалами в две или три недели. В альтернативном варианте, олигонуклеотиды можно вводить ежедневно. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят одну или большее количество нагрузочных доз олигонуклеотида, а затем одну или большее количество поддерживающих доз олигонуклеотида.

[00199] В некоторых вариантах осуществления субъект, который подвергается лечению, представляет собой человека или примата, не относящимся к человеку, или другое млекопитающее. Другие примеры субъектов включают домашних животных, таких как собаки и кошки; домашний скот, такой как лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, козы и куры; и животные, такие как мыши, крысы, морские свинки и хомяки.

[00200] V. Наборы

[00201] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предлагается набор, содержащий описанный в данном документе олигонуклеотид, и инструкции по применению. В некоторых вариантах осуществления указанный набор содержит описанный в данном документе олигонуклеотид и листок-вкладыш, содержащий инструкции по применению набора и/или любого его компонента. В некоторых вариантах осуществления набор содержит в подходящем контейнере олигонуклеотид, описанный в данном документе, один или большее количество контролей и различные буферы, реагенты, ферменты и другие стандартные ингредиенты, хорошо известные в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления указанный контейнер содержит по меньшей мере один флакон, лунку, пробирку, колбу, бутылку, шприц или другое контейнерное средство, в которое помещают олигонуклеотид, а в некоторых случаях подходящим образом делят на аликвоты. В некоторых вариантах осуществления, в которых предусмотрен дополнительный компонент, указанный набор содержит дополнительные контейнеры, в которые этот компонент помещается. Указанные наборы также включают средства для хранения олигонуклеотида и любого другого реагента в закрытом виде для коммерческой продажи. Такие контейнеры могут включать пластиковые контейнеры, изготовленные методом литья под давлением или выдувным формованием, в которых хранятся нужные флаконы. Контейнеры и/или наборы могут иметь этикетки с инструкциями по применению и/или предупреждениями.

[00202] В некоторых вариантах осуществления набор содержит олигонуклеотид, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтическую композицию, содержащую олигонуклеотид и инструкции по лечению или замедлению прогрессирования заболевания, нарушения или патологического состояния, ассоциированного с экспрессией ANGPTL3, у субъекта, нуждающегося в этом.

#### ПРИМЕРЫ

[00203] Хотя данное изобретение было описано со ссылкой на конкретные варианты осуществления, изложенные в следующих Примерах, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что могут быть сделаны различные изменения и могут быть заменены эквиваленты без отклонения от истинной сущности и объема изобретения. Кроме того, следующие Примеры предлагаются в качестве иллюстрации и никоим образом не предназначены для ограничения объема изобретения. Кроме того, могут быть осуществлены модификации с целью адаптации конкретной ситуации, материала, химической композиции, процесса, этапа или этапов процесса к предмету, сути и объему настоящего изобретения. Предполагается, что все такие модификации входят в объем настоящего изобретения. Используются стандартные методики, хорошо известные в данной области техники, или методики, конкретно описанные ниже.

[00204] **Пример 1: Получение двухцепочечных олигонуклеотидов РНКi**

[00205] *Синтез и очистка олигонуклеотидов*

[00206] Описанные в приведенных выше примерах ds РНКi олигонуклеотиды химически синтезируют с помощью описанных в данном документе способов. Как правило, ds РНКi олигонуклеотиды синтезируют с помощью методов твердофазного синтеза олигонуклеотидов, как описано для 19-23-членных siРНК (см., например, Scaringe et al. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:5433-5441 и Usman et al. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109:7845-7845; см. также, патенты США №№ 5 804 683; 5 831 071; 5 998 203; 6 008 400; 6 111 086; 6 117 657; 6 353 098; 6 362 323; 6 437 117 и 6 469 158).

[00207] Отдельные цепи РНК синтезируют и очищают HPLC в соответствии со стандартными методами

(Integrated DNA Technologies; Коралвилл, штат Айова). Например, олигонуклеотиды РНК синтезируют с помощью твердофазной фосфорамидитной химии, снимают защиту и обессоливают на колонках NAP-5 (Amersham Pharmacia Biotech; Пискатауэй, штат Нью-Джерси) с помощью стандартных методик (Damha & Olgivie (1993) *Methods Mol. Biol.* 20:81-114; Wincott *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:2677-2684). Олигомеры очищают с помощью ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (IE-HPLC) на колонке Amersham Source 15Q (1,0 см × 25 см; Amersham Pharmacia Biotech) с использованием 15-минутного ступенчатого линейного градиента. Градиент варьируется от 90:10 буферов А:В до 52:48 буферов А:В, при этом буфер А представляет собой 100 мМ Tris, pH 8,5, а буфер В представляет собой 100 мМ Tris, pH 8,5, 1 М NaCl. Образцы контролировали при 260 нм и пики, соответствующие полноразмерным олигонуклеотидам, собирали, объединяли, обессоливали на колонках NAP-5 и лиофилизировали.

[00208] Чистоту каждого олигомера определяли с помощью капиллярного электрофореза (CE) на приборе Beckman PACE 5000 (Beckman Coulter, Inc.; Фуллертон, штат Калифорния). Капилляры CE имеют внутренний диаметр 100 мкм и содержат гель ssДНК 100R (Beckman-Coulter). Обычно около 0,6 нмоль олигонуклеотида вводили в капилляр, пропускали в электрическом поле 444 В/см и определяли по поглощению УФ-излучения при 260 нм. Денатурирующий рабочий буфер Tris-Борат-7 М-мочевина приобретали у Beckman-Coulter. Получали олигорибонуклеотиды со степенью чистоты по меньшей мере 90% по оценке CE для использования в экспериментах, описанных ниже. Идентичность соединения верифицировали с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной десорбцией и ионизацией с использованием матрицы (MALDI-TOF) на биоспектрометрической рабочей станции Voyager DE™ (Applied Biosystems; Фостер-Сити, штат Калифорния) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Получали относительные молекулярные массы всех олигомеров, часто в пределах 0,2% от ожидаемой молекулярной массы.

[00209] *Приготовление дуплексов*

[00210] ssРНК олигомеры ресуспендировали (*например*, при концентрации 100 мкМ) в дуплексном буфере, состоящем из 100 мМ ацетата калия, 30 мМ HEPES, pH 7,5. Комплементарные смысловые и антисмысловые цепи смешивали в равных молярных количествах с получением конечного раствора, например, 50 мкМ дуплекса. Образцы нагревали до 100° С в течение 5' минут в РНК-буфере (IDT) и давали им остыть до комнатной температуры перед использованием. ds РНК олигонуклеотиды хранили при температуре -20 °С. ss РНК олигомеры хранили лиофилизированными или в воде без нуклеаз при -80 °С.

[00211] **Пример 2: Ингибирование экспрессии ANGPTL3 олигонуклеотидами РНКi *In Vitro***

[00212] *Идентификация целевой последовательности ANGPTL3*

[00213] Для идентификации РНКi олигонуклеотидов - ингибиторов экспрессии ANGPTL3 РНКi, применяли компьютерный алгоритм для машинной генерации целевых последовательностей ANGPTL3, пригодных для анализа ингибирования экспрессии ANGPTL3 посредством пути РНКi. Алгоритм предоставляет последовательности направляющих цепей РНКi олигонуклеотидов, которые комплементарны подходящим ANGPTL3 целевым последовательностям мРНК ANGPTL3 человека (*например*, SEQ ID NO: 128; **Таблица 1**). Примеры целевых последовательностей мРНК ANGPTL3 человека представлены в **Таблице 2**. Некоторые из последовательностей направляющих цепей, идентифицированных с помощью алгоритма, также комплементарны соответствующей целевой последовательности ANGPTL3 обезьяны и/или мыши мРНК ANGPTL3 (SEQ ID NO: 129 и 130, соответственно; **Таблица 1**). Получали 384 ds РНКi олигонуклеотида (в формате DsiРНК олигонуклеотидов), каждый из которых имеет уникальную направляющую цепь, имеющую область комплементарности целевой последовательности ANGPTL3, идентифицированной алгоритмом.

[00214] **Таблица 1:** Последовательности мРНК ANGPTL3 человека, обезьяны и мыши

Вид	GenBank ссыл. послед #	SEQ ID NO
Человек (Hs)	NM_014495.4	128
Обезьяна <i>Сynomolgus</i> (Mf)	XM_005543185.2	129
Мышь (Mm)	NM_013913.4	130
Крыса (Rn)	NM_001025065.1	131

[00215] **Таблица 2:** Примеры целевых последовательностей мРНК ANGPTL3 человека

Целевая последовательность	SEQ ID NO
CUCAACAUAUUUGAUCAGU	117
AGAGCCAAAAUCAAGAUUU	118
CAAAAUCAAGAUUUGCUAU	119
GAGAAGAACUACAUAUAAA	120
GUAGAAAAACAAGAUAAUA	121
UAGAAAAACAAGAUAAUAG	122
AGAAAAACAAGAUAAUAGC	123
AACAGCAUAGUCAAAUAAA	124
UCAAAAUGGAAGGUUAUAC*	125
AAAUGGAAGGUUAUACUCU	126
GAAGGUUAUACUCUAUAAA	127

[00216] *Клеточные анализы in Vitro*

[00217] Способность каждой из 384 DsiPHK, указанных выше, ингибировать экспрессию ANGPTL3 определяют с помощью клеточных анализов *in vitro*. Вкратце, клетки печени человека HuH-7, стабильно экспрессирующие ANGPTL3, трансфицировали каждой из DsiPHK (0,5 нМ) в отдельных лунках многолуночного планшета для культивирования клеток. Клетки выдерживали в течение 24 часов после трансфекции, а затем определяли уровни оставшейся мРНК ANGPTL3 из трансфицированных клеток с помощью анализа qPCR на основе TAQMAN®. Для определения уровней мРНК, измеренных с помощью зондов HEX и FAM, применяют два анализа qPCR: 3'-анализ и 5'-анализ.

[00218] Результаты анализа на основе клеток HuH-7 с 384 DsiPHK приведены на **Фиг. 1** и **Фиг. 2**. **Фиг. 1** демонстрирует результаты анализа на основе клеток HuH-7 с 109 DsiPHK, которые имеют направляющие цепи, комплементарные мРНК ANGPTL3 человека, обезьяны и мыши («тройная общая»). Трансфекция тройной общей DsiPHK, которая приводит к тому, что в клетках остается меньше или равно 35% мРНК ANGPTL3 по сравнению с отрицательным контролем, считается кандидатом на ингибитор экспрессии ANGPTL3 (называемым в данном документе «попаданием»). **Фиг. 2** демонстрирует результаты анализа на основе клеток HuH-7 с 275 DsiPHK, которые имеют направляющие цепи, комплементарные мРНК ANGPTL3 человека и обезьяны («человек-обезьяна»). DsiPHK «человек-обезьяна», в результате которых осталось меньше или равно 30% мРНК ANGPTL3 по сравнению с отрицательным контролем, также считаются попаданиями. На **Фиг. 1** и **Фиг. 2** процент оставшейся мРНК показан для каждого из анализов: 3'-анализ (кружки) и 5'-анализ (ромбы).

[00219] Эти результаты демонстрируют, что DsiPHK, предназначенные для нацеливания на мРНК ANGPTL3 человека, ингибируют экспрессию ANGPTL3 в клетках (о чем свидетельствует сниженное количество мРНК ANGPTL3 в клетках, трансфицированных DsiPHK), и что нуклеотидные последовательности, содержащие попадания DsiPHK, пригодны для создания олигонуклеотидов РНКi для ингибирования экспрессии ANGPTL3. Кроме того, эти результаты демонстрируют, что множественные целевые последовательности ANGPTL3 пригодны для РНКi-опосредованного ингибирования экспрессии ANGPTL3.

[00220] **Пример 3: Ингибирование экспрессии ANGPTL3 олигонуклеотидами РНКi *In Vivo***

[00221] Из 384 DsiPHK, скринированных в анализах на основе клеток HuH-7, описанных в **Примере 2**, нуклеотидные последовательности 55 попаданий DsiPHK (**Таблица 3**) выбирают для дальнейшей оценки *in vivo*. Вкратце, нуклеотидные последовательности 55 выбранных DsiPHK используют для создания 55 соответствующих двухцепочечных олигонуклеотидов РНКi, содержащих разорванную тетрапетельную GalNAc-конъюгированную структуру (обозначаемую в настоящем документе как «GalNAc-конъюгированные олигонуклеотиды ANGPTL3»), имеющую 36-мерную сопровождающую цепь и 22-мерную направляющую цепь. Кроме того, нуклеотидные последовательности, включающие сопровождающую цепь и направляющую цепь GalNAc-конъюгированных олигонуклеотидов ANGPTL3, имеют четкую структуру модифицированных нуклеотидов и фосфоротиоатных связей (*см., например, Фиг. 3*, на которой изображена схема генерической структуры и профили химической модификации GalNAc-конъюгированных олигонуклеотидов ANGPTL3). Каждый из трех нуклеотидов аденозина, составляющих тетрапетлю, конъюгирован с фрагментом GalNAc (CAS#: 14131-60-3).

[00222] **Таблица 3:** GalNAc-конъюгированные олигонуклеотиды ANGPTL3, оцененные на мышах

Олигонуклеотид	DP#	SEQ ID NO (смысловая)	SEQ ID NO (антисмысловая)
ANGPTL3-0099-M1	DP14993P:DP14992G	1	2
ANGPTL3-0108-M1	DP14995P:DP14994G	3	4
ANGPTL3-0111-M1	DP14997P:DP14996G	5	6
ANGPTL3-0112-M1	DP14999P:DP14998G	7	8
ANGPTL3-0143-M1	DP15001P:DP15000G	9	10
ANGPTL3-0165-M1	DP15003P:DP15002G	11	12
ANGPTL3-0167-M1	DP15005P:DP15004G	13	14
ANGPTL3-0170-M1	DP15007P:DP15006G	15	16
ANGPTL3-0196-M1	DP15009P:DP15008G	17	18
ANGPTL3-0197-M1	DP15011P:DP15010G	19	20
ANGPTL3-0198-M1	DP15013P:DP15012G	21	22
ANGPTL3-0201-M1	DP15015P:DP15014G	23	24
ANGPTL3-0202-M1	DP15017P:DP15016G	25	26
ANGPTL3-0203-M1	DP15019P:DP15018G	27	28
ANGPTL3-0212-M1	DP15021P:DP15020G	29	30
ANGPTL3-0303-M1	DP15023P:DP15022G	31	32

ANGPTL3-0310-M1	DP15025P:DP15024G	33	34
ANGPTL3-0330-M1	DP15027P:DP15026G	35	36
ANGPTL3-0332-M1	DP15029P:DP15028G	37	38
ANGPTL3-0333-M1	DP15031P:DP15030G	39	40
ANGPTL3-0337-M1	DP15033P:DP15032G	41	42
ANGPTL3-0394-M1	DP15035P:DP15034G	43	44
ANGPTL3-0396-M1	DP15037P:DP15036G	45	46
ANGPTL3-0400-M1	DP15039P:DP15038G	47	48
ANGPTL3-0401-M1	DP15041P:DP15040G	49	50
ANGPTL3-0437-M1	DP15043P:DP15042G	51	52
ANGPTL3-0447-M1	DP15045P:DP15044G	53	54
ANGPTL3-0517-M1	DP15047P:DP15046G	55	56
ANGPTL3-0518-M1	DP15049P:DP15048G	57	58
ANGPTL3-0532-M1	DP15051P:DP15050G	59	60
ANGPTL3-0541-M1	DP15053P:DP15052G	61	62
ANGPTL3-0582-M1	DP15055P:DP15054G	63	64
ANGPTL3-0602-M1	DP15057P:DP15056G	65	66
ANGPTL3-0603-M1	DP15059P:DP15058G	67	68
ANGPTL3-0604-M1	DP15061P:DP15060G	69	70
ANGPTL3-0606-M1	DP15063P:DP15062G	71	72
ANGPTL3-0607-M1	DP15065P:DP15064G	73	74
ANGPTL3-0608-M1	DP15067P:DP15066G	75	76
ANGPTL3-0610-M1	DP15069P:DP15068G	77	78
ANGPTL3-0676-M1	DP15071P:DP15070G	79	80
ANGPTL3-0738-M1	DP15073P:DP15072G	81	82
ANGPTL3-0796-M1	DP15075P:DP15074G	83	84
ANGPTL3-0893-M1	DP15077P:DP15076G	85	86
ANGPTL3-0894-M1	DP15079P:DP15078G	87	88
ANGPTL3-0895-M1	DP15081P:DP15080G	89	90
ANGPTL3-1059-M1	DP15083P:DP15082G	91	92
ANGPTL3-1062-M1	DP15085P:DP15084G	93	94
ANGPTL3-1065-M1	DP15087P:DP15086G	95	96
ANGPTL3-1071-M1	DP15089P:DP15088G	97	98
ANGPTL3-1412-M1	DP15091P:DP15090G	99	100
ANGPTL3-1415-M1	DP15093P:DP15092G	101	102
ANGPTL3-1420-M1	DP15095P:DP15094G	103	104
ANGPTL3-1421-M1	DP15097P:DP15096G	105	106
ANGPTL3-1422-M1	DP15099P:DP15098G	107	108

ANGPTL3-1468-M1	DP15101P:DP15100G	109	110
ANGPTL3-0204-M2	DP13439P:DP13438G	111	112
ANGPTL3-0327-M2	DP13443P:DP13442G	113	114
ANGPTL3-1327-M2	DP13465P:DP13464G	115	116

[00223] *Исследования на мышах*

[00224] Олигонуклеотиды ANGPTL3, конъюгированные с GalNAc, перечисленные в **Таблице 3**, оценивали на мышах, сконструированных для транзиторной экспрессии мРНК ANGPTL3 человека в гепатоцитах. Три олигонуклеотида ANGPTL3, конъюгированные с GalNAc (ANGPTL3-0204-M2, ANGPTL3-0327-M2 и ANGPTL3-1327-M2), применяли в качестве эталонных контролей. Вкратце, 6-8-недельным самкам мышей CD-1 подкожно вводили олигонуклеотид ANGPTL3, конъюгированный с GalNAc, в дозе 1 мг/кг. Через три дня (72 ч) мышам гидродинамически вводили ДНК-плазмиду, кодирующую полный ген ANGPTL3 человека под контролем убиквитарной промоторной последовательности цитомегаловируса (CMV). Через день после введения плазмиды собирали образцы печени. Общую РНК, полученную от этих мышей, подвергали анализу qRT-PCR на наличие мРНК ANGPTL3, по сравнению с мышами, которым вводили только идентичный объем PBS. Значения нормализовали для эффективности трансфекции с применением гена NeoR, включенного в плазмиду.

[00225] Как продемонстрировано на **Фиг. 4**, все протестированные олигонуклеотиды ANGPTL3, конъюгированные с GalNAc, подавляют экспрессию ANGPTL3, что определяется снижением количества мРНК ANGPTL3 в образцах печени мышей, получавших олигонуклеотиды, по сравнению с мышами, получавшими PBS. Средний % оставшейся мРНК ANGPTL3 в образцах печени мышей, получавших эталонный GalNAc-конъюгированный олигонуклеотид ANGPTL3 ANGPTL3-0327 по сравнению с мышами, получавшими PBS, показан сплошной полосой. **Фиг. 4** демонстрирует, что 26 из 55 протестированных олигонуклеотидов ANGPTL3, конъюгированных с GalNAc, подавляют экспрессию ANGPTL3 в большей степени, чем эталонный олигонуклеотид ANGPTL3-0327, конъюгированный с GalNAc. На основании этих результатов 10 из 55 олигонуклеотидов ANGPTL3, конъюгированных с GalNAc, указанных стрелками на **Фиг. 4** и перечисленных в **Таблице 4**, были отобраны для оценки их способности ингибировать экспрессию ANGPTL3 в NHP. 10 олигонуклеотидов ANGPTL3, конъюгированных с GalNAc и перечисленных в **Таблице 4**, включают химически модифицированные нуклеотиды, имеющие шаблон M1 или M2, как описано в **Фиг. 3**.

[00226] **Таблица 4:** Олигонуклеотиды ANGPTL3, конъюгированные с GalNAc, оцененные в NHP

Олигонуклеотид	DP#	SEQ ID NO (смысловая)	SEQ ID NO (антисмысловая)
ANGPTL3-0327-M2	DP13443P:DP13442G	113	114
ANGPTL3-0197-M1	DP15011P:DP15010G	19	20
ANGPTL3-0202-M1	DP15017P:DP15016G	25	26
ANGPTL3-0401-M1	DP15041P:DP15040G	49	50
ANGPTL3-0606-M1	DP15063P:DP15062G	71	72
ANGPTL3-0607-M1	DP15065P:DP15064G	73	74
ANGPTL3-0608-M1	DP15067P:DP15066G	75	76

ANGPTL3-0676-M1	DP15071P:DP15070G	79	80
ANGPTL3-1412 -M1	DP15091P:DP15090G	99	100
ANGPTL3-1415-M1	DP15093P:DP15092G	101	102
ANGPTL3-1420-M1	DP15095P:DP15094G	103	104

Таблица А: Информация о последовательности олигонуклеотидов из Таблиц 3 и 4.

DP номер, сопров. ождающ. : направ. ляющая	Профиль модификации	Последовательность с модификациями	Соответствующая немодифицированная последовательность
DP1499 3P:DP1 4992G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mAs][mU][mA][mA][mA][mA][mA][fU][fG][fU][fU][mC][mA][mC][mA][mA][mU][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:132)	AUAAAAAUGUUCA CAAUUAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:1)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[MeФосфонат-4O-mUs][fUs][fAs][fA][fU][mU][fG][mU][mG][fA][mA][mC][mA][fU][mU][mU][mU][mU][mU][mA][mUs][mGs][mG] (SEQ ID NO:133)	UUAAUUGUGAACA UUUUUAUGG (SEQ ID NO:2)
DP1499 5P:DP1 4994G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mUs][mU][mC][mA][mC][mA][mA][fU][fU][fA][fA][mG][mC][mU][mC][mC][mU][mU][mC][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:134)	UUCACAAUUAAGC UCCUUCAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:3)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[MeФосфонат-4O-mUs][fGs][fAs][fA][fG][mG][fA][mG][mC][fU][mU][mA][mA][fU][mU][mG][mU][mG][mA][mAs][mGs][mG] (SEQ ID NO:135)	UGAAGGAGCUUAA UUGUGAAGG (SEQ ID NO:4)
DP1499 7P:DP1 4996G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mAs][mC][mA][mA][mU][mU][mA][fA][fG][fC][fU][mC][mC][mU][mU][mC][mU][mU][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:136)	ACAAUUAAGCUCC UUCUUUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:5)

	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[MeФосфонат-4O- mUs][fAs][fAs][fA][fG][mA][fA][mG][mG][fA][ mG][mC][mU][fU][mA][mA][mU][mU][mG][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:137)	UAAAGAAGGAGCU UAAUUGUGG (SEQ ID NO:6)
DP1499 9P:DP1 4998G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mCs][mA][mA][mU][mU][mA][mA][fG][fC][f U][fC][mC][mU][mU][mC][mU][mU][mU][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:138)	CAAUUAAGCUCCU UCUUUUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:7)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[MeФосфонат-4O- mUs][fAs][fAs][fA][fA][mG][fA][mA][mG][fG][ mA][mG][mC][fU][mU][mA][mA][mU][mU][m Gs][mGs][mG] (SEQ ID NO:139)	UAAAAGAAGGAGC UUAUUGGG (SEQ ID NO:8)
DP1500 1P:DP1 5000G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mAs][mG][mU][mU][mA][mU][mU][fU][fC][f C][fU][mC][mC][mA][mG][mA][mA][mU][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:140)	AGUUAUUUCCUCC AGAAUUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:9)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[MeФосфонат-4O- mUs][fAs][fAs][fU][fU][mC][fU][mG][mG][fA][ mG][mG][mA][fA][mA][mU][mA][mA][mC][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:141)	UAAUUCUGGAGGA AAU AACUGG (SEQ ID NO:10)
DP1500 3P:DP1 5002G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mCs][mA][mA][mG][mA][mC][mA][fA][fU][f U][fC][mA][mU][mC][mA][mU][mU][mU][mG] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:142)	CAAGACAAUUCAU CAUUUGAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:11)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[MeФосфонат-4O- mUs][fCs][fAs][fA][fA][mU][fG][mA][mU][fG][ mA][mA][mU][fU][mG][mU][mC][mU][mU][m Gs][mGs][mG] (SEQ ID NO:143)	UCAAUGAUGAAU UGUCUUGGG (SEQ ID NO:12)
DP1500 5P:DP1 5004G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mAs][mG][mA][mC][mA][mA][mU][fU][fC][f A][fU][mC][mA][mU][mU][mU][mG][mA][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:144)	AGACAAUUCAUCA UUUGAUAGCAGCC GAAAGGCUGC

	GalNAc][adem-GalNAc][adem-GalNAc]MMMMMM	A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:144)	(SEQ ID NO:13)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fAs][fUs][fC][fA][mA][fA][mU][mG][fA][ mU][mG][mA][fA][mU][mU][mG][mU][mC][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:145)	UAUCAAAUGAUGA AUUGUCUGG (SEQ ID NO:14)
DP1500 7P:DP1 5006G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem-GalNAc][adem-GalNAc][adem-GalNAc]MMMMMM	[mCs][mA][mA][mU][mU][mC][mA][fU][fC][f A][fU][mU][mU][mG][mA][mU][mU][mC][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:146)	CAAUUCAUCAUUU GAUUCUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:15)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fAs][fGs][fA][fA][mU][fC][mA][mA][fA][ mU][mG][mA][fU][mG][mA][mA][mU][mU][m Gs][mGs][mG] (SEQ ID NO:147)	UAGAAUCAAAUGA UGAAUUGGG (SEQ ID NO:16)
DP1500 9P:DP1 5008G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem-GalNAc][adem-GalNAc][adem-GalNAc]MMMMMM	[mCs][mA][mG][mA][mG][mC][mC][fA][fA][f A][fA][mU][mC][mA][mA][mG][mA][mU][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:148)	CAGAGCCAAAUAUC AAGAUUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:17)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fAs][fAs][fU][fC][mU][fU][mG][mA][fU][ mU][mU][mU][fG][mG][mC][mU][mC][mU][m Gs][mGs][mG] (SEQ ID NO:149)	UAAUCUUGAUUUU GGCUCUGGG (SEQ ID NO:18)
DP1501 1P:DP1 5010G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem-GalNAc][adem-GalNAc][adem-GalNAc]MMMMMM	[mAs][mG][mA][mG][mC][mC][mA][fA][fA][f A][fU][mC][mA][mA][mG][mA][mU][mU][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:150)	AGAGCCAAAUAUCA AGAUUUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:19)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fAs][fAs][fA][fU][mC][fU][mU][mG][fA][ mU][mU][mU][fU][mG][mG][mC][mU][mC][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:151)	UAAAUCUUGAUUU UGGCUCUGG (SEQ ID NO:20)

DP1501 3P:DP1 5012G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mGs][mA][mG][mC][mC][mA][mA][fA][fA][f U][fC][mA][mA][mG][mA][mU][mU][mU][mG] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:152)	GAGCCAAAUAUCAA GAUUUGAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:21)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fCs][fAs][fA][fA][mU][fC][mU][mU][fG][ mA][mU][mU][fU][mU][mG][mG][mC][mU][m Cs][mGs][mG] (SEQ ID NO:153)	UCAAUCUUGAUU UUGGCUCGG (SEQ ID NO:22)
DP1501 5P:DP1 5014G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mCs][mC][mA][mA][mA][mA][mU][fC][fA][f A][fG][mA][mU][mU][mU][mG][mC][mU][mA] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:154)	CCAAAUCAAGAU UUGCUAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:23)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fUs][fAs][fG][fC][mA][fA][mA][mU][fC][ mU][mU][mG][fA][mU][mU][mU][mU][mG][m Gs][mGs][mG] (SEQ ID NO:155)	UUAGCAAUCUUG AUUUUGGGG (SEQ ID NO:24)
DP1501 7P:DP1 5016G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mCs][mA][mA][mA][mA][mU][mC][fA][fA][f G][fA][mU][mU][mU][mG][mC][mU][mA][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:156)	CAAAAUCAAGAUU UGCUAUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:25)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fAs][fUs][fA][fG][mC][fA][mA][mA][fU][ mC][mU][mU][fG][mA][mU][mU][mU][mU][m Gs][mGs][mG] (SEQ ID NO:157)	UAUAGCAAUCUU GAUUUUGGG (SEQ ID NO:26)
DP1501 9P:DP1 5018G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mAs][mA][mA][mA][mU][mC][mA][fA][fG][f A][fU][mU][mU][mG][mC][mU][mA][mU][mG] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:158)	AAAAUCAAGAUU GCUAUGAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:27)

	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fCs][fAs][fU][fA][mG][fC][mA][mA][fA][ mU][mC][mU][fU][mG][mA][mU][mU][mU][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:159)	UCAUAGCAAUCU UGAUUUUGG (SEQ ID NO:28)
DP1502 1P:DP1 5020G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mAs][mU][mU][mU][mG][mC][mU][fA][fU][f G][fU][mU][mA][mG][mA][mC][mG][mA][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:160)	AUUUGCUAUGUUA GACGAUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:29)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fAs][fUs][fC][fG][mU][fC][mU][mA][fA][ mC][mA][mU][fA][mG][mC][mA][mA][mA][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:161)	UAUCGUCUAAACAU AGCAAUGG (SEQ ID NO:30)
DP1502 3P:DP1 5022G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mCs][mA][mA][mA][mU][mU][mA][fA][fU][f G][fA][mC][mA][mU][mA][mU][mU][mU][mC] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:162)	CAAUUAAUGACA UAUUUCAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:31)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fGs][fAs][fA][fA][mU][fA][mU][mG][fU][ mC][mA][mU][fU][mA][mA][mU][mU][mU][m Gs][mGs][mG] (SEQ ID NO:163)	UGAAUAUGUCAU UAAUUUGG (SEQ ID NO:32)
DP1502 5P:DP1 5024G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mAs][mU][mG][mA][mC][mA][mU][fA][fU][f U][fU][mC][mA][mA][mA][mA][mA][mC][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:164)	AUGACAUUUUCA AAAACUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:33)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fAs][fGs][fU][fU][mU][fU][mU][mG][fA][ mA][mA][mU][fA][mU][mG][mU][mC][mA][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:165)	UAGUUUUUGAAAU AUGUCAUGG (SEQ ID NO:34)
DP1502 7P:DP1 5026G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mAs][mA][mC][mA][mU][mA][mU][fU][fU][f G][fA][mU][mC][mA][mG][mU][mC][mU][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:166)	AACAUAUUUGAUC AGUCUUAGCAGCC GAAAGGCUGC

	GalNAc][adem-GalNAc][adem-GalNAc]MMMMMM	A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:166)	(SEQ ID NO:35)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-40- mUs][fAs][fAs][fG][fA][mC][fU][mG][mA][fU][ mC][mA][mA][fA][mU][mA][mU][mG][mU][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:167)	UAAGACUGAUCAA AUAUGUUGG (SEQ ID NO:36)
DP1502 9P:DP1 5028G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mCs][mA][mU][mA][mU][mU][mU][fG][fA][f U][fC][mA][mG][mU][mC][mU][mU][mU][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:168)	CAUAUUUGAUCAG UCUUUUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:37)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-40- mUs][fAs][fAs][fA][fA][mG][fA][mC][mU][fG][ mA][mU][mC][fA][mA][mA][mU][mA][mU][m Gs][mGs][mG] (SEQ ID NO:169)	UAAAAGACUGAUC AAAUAUGGG (SEQ ID NO:38)
DP1503 1P:DP1 5030G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mAs][mU][mA][mU][mU][mU][mG][fA][fU][f C][fA][mG][mU][mC][mU][mU][mU][mU][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:170)	AUAUUUGAUCAGU CUUUUUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:39)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-40- mUs][fAs][fAs][fA][fA][mA][fG][mA][mC][fU][ mG][mA][mU][fC][mA][mA][mA][mU][mA][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:171)	UAAAAGACUGAU CAAUAUGG (SEQ ID NO:40)
DP1503 3P:DP1 5032G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mUs][mU][mG][mA][mU][mC][mA][fG][fU][f C][fU][mU][mU][mU][mU][mA][mU][mG][mA] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:172)	UUGAUCAGUCUUU UUAUGAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:41)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-40- mUs][fUs][fCs][fA][fU][mA][fA][mA][mA][fA][ mG][mA][mC][fU][mG][mA][mU][mC][mA][m As][mGs][mG] (SEQ ID NO:173)	UUCAUAAAAGAC UGAUCAAGG (SEQ ID NO:42)

DP1503 5P:DP1 5034G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mAs][mG][mG][mA][mA][mC][mU][fG][fA][f G][fA][mA][mG][mA][mA][mC][mU][mA][mC] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:174)	AGGAACUGAGAAG AACUACAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:43)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fGs][fUs][fA][fG][mU][fU][mC][mU][fU][ mC][mU][mC][fA][mG][mU][mU][mC][mC][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:175)	UGUAGUUCUUCUC AGUUCUGG (SEQ ID NO:44)
DP1503 7P:DP1 5036G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mGs][mA][mA][mC][mU][mG][mA][fG][fA][f A][fG][mA][mA][mC][mU][mA][mC][mA][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:176)	GAACUGAGAAGAA CUACAUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:45)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fAs][fUs][fG][fU][mA][fG][mU][mU][fC][ mU][mU][mC][fU][mC][mA][mG][mU][mU][m Cs][mGs][mG] (SEQ ID NO:177)	UAUGUAGUUCUUC UCAGUUCGG (SEQ ID NO:46)
DP1503 9P:DP1 5038G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mUs][mG][mA][mG][mA][mA][mG][fA][fA][f C][fU][mA][mC][mA][mU][mA][mU][mA][mA] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:178)	UGAGAAGAACUAC AUAAUAAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:47)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fUs][fUs][fA][fU][mA][fU][mG][mU][fA][ mG][mU][mU][fC][mU][mU][mC][mU][mC][m As][mGs][mG] (SEQ ID NO:179)	UUUAUAUGUAGUU CUUCUCAGG (SEQ ID NO:48)
DP1504 1P:DP1 5040G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mGs][mA][mG][mA][mA][mG][mA][fA][fC][f U][fA][mC][mA][mU][mA][mU][mA][mA][mA] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:180)	GAGAAGAACUACA UAUAAAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:49)

	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[MeФосфонат-4O- mUs][fUs][fUs][fU][fA][mU][fA][mU][mG][fU][ mA][mG][mU][fU][mC][mU][mU][mC][mU][m Cs][mGs][mG] (SEQ ID NO:181)	UUUUAUAUGUAGU UCUUCUCGG (SEQ ID NO:50)
DP1504 3P:DP1 5042G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mAs][mG][mA][mG][mG][mU][mA][fA][fA][f G][fA][mA][mU][mA][mU][mG][mU][mC][mA] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:182)	AGAGGUAAGAAGU AUGUCAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:51)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[MeФосфонат-4O- mUs][fUs][fGs][fA][fC][mA][fU][mA][mU][fU][ mC][mU][mU][fU][mA][mC][mC][mU][mC][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:183)	UUGACAUAUUCU UACCUCUGG (SEQ ID NO:52)
DP1504 5P:DP1 5044G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mAs][mA][mU][mA][mU][mG][mU][fC][fA][f C][fU][mU][mG][mA][mA][mC][mU][mC][mA] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:184)	AAUAUGUCACUUG AACUCAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:53)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[MeФосфонат-4O- mUs][fUs][fGs][fA][fG][mU][fU][mC][mA][fA][ mG][mU][mG][fA][mC][mA][mU][mA][mU][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:185)	UUGAGUUCAAGUG ACAUUUGG (SEQ ID NO:54)
DP1504 7P:DP1 5046G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mUs][mG][mA][mA][mA][mU][mA][fU][fU][f U][fA][mG][mA][mA][mG][mA][mG][mC][mA] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:186)	UGAAAUAUUUAGA AGAGCAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:55)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[MeФосфонат-4O- mUs][fUs][fGs][fC][fU][mC][fU][mU][mC][fU][ mA][mA][mA][fU][mA][mU][mU][mU][mC][m As][mGs][mG] (SEQ ID NO:187)	UUGCUCUUCUAAA UAUUUCAGG (SEQ ID NO:56)
DP1504 9P:DP1 5048G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem-	[mGs][mA][mA][mA][mU][mA][mU][fU][fU][f A][fG][mA][mA][mG][mA][mG][mC][mA][mA] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem	GAAAUAUUUAGAA GAGCAAAGCAGCC GAAAGGCUGC

	GalNAc][adem-GalNAc][adem-GalNAc]MMMMMM	A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:188)	(SEQ ID NO:57)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O-mUs][fUs][fUs][fG][fC][mU][fC][mU][mU][fC][mU][mA][mA][fA][mU][mA][mU][mU][mU][mCs][mGs][mG] (SEQ ID NO:189)	UUUGCUCUUCUAA AUUUUCGG (SEQ ID NO:58)
DP1505 1P:DP1 5050G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem-GalNAc][adem-GalNAc][adem-GalNAc]MMMMMM	[mAs][mG][mC][mA][mA][mC][mU][fA][fA][fC][fU][mA][mA][mC][mU][mU][mA][mA][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:190)	AGCAACUAACUAA CUUAAUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:59)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O-mUs][fAs][fUs][fU][fA][mA][fG][mU][mU][fA][mG][mU][mU][mG][mC][mUs][mGs][mG] (SEQ ID NO:191)	UAUUAGUUAGUU AGUUGCUGG (SEQ ID NO:60)
DP1505 3P:DP1 5052G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem-GalNAc][adem-GalNAc][adem-GalNAc]MMMMMM	[mCs][mU][mA][mA][mC][mU][mU][fA][fA][fU][fU][mC][mA][mA][mA][mA][mU][mC][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:192)	CUAACUAAUUCA AAAUCAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:61)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O-mUs][fUs][fGs][fA][fU][mU][fU][mU][mG][fA][mA][mU][mU][fA][mA][mG][mU][mU][mA][mGs][mGs][mG] (SEQ ID NO:193)	UUGAUUUUGAAUU AAGUUAGGG (SEQ ID NO:62)
DP1505 5P:DP1 5054G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem-GalNAc][adem-GalNAc][adem-GalNAc]MMMMMM	[mGs][mA][mA][mG][mU][mA][mA][fC][fU][fU][fC][mA][mC][mU][mU][mA][mA][mA][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:194)	GAAGUAACUUCAC UUAAAAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:63)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O-mUs][fUs][fUs][fU][fU][mA][fA][mG][mU][fG][mA][mA][mG][fU][mU][mA][mC][mU][mU][mCs][mGs][mG] (SEQ ID NO:195)	UUUUUAGUGAAG UUACUUCGG (SEQ ID NO:64)

DP1505 7P:DP1 5056G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mUs][mU][mU][mU][mG][mU][mA][fG][fA][f A][fA][mA][mA][mC][mA][mA][mG][mA][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:196)	UUUUGUAGAAAAA CAAGAUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:65)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fAs][fUs][fC][fU][mU][fG][mU][mU][fU][ mU][mU][mC][fU][mA][mC][mA][mA][mA][m As][mGs][mG] (SEQ ID NO:197)	UAUCUUGUUUUUC UACAAAAGG (SEQ ID NO:66)
DP1505 9P:DP1 5058G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mUs][mU][mU][mG][mU][mA][mG][fA][fA][f A][fA][mA][mC][mA][mA][mG][mA][mU][mA] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:198)	UUUGUAGAAAAAC AAGAUAAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:67)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fUs][fAs][fU][fC][mU][fU][mG][mU][fU][ mU][mU][mU][fC][mU][mA][mC][mA][mA][m As][mGs][mG] (SEQ ID NO:199)	UUAUCUUGUUUUU CUACAAAAGG (SEQ ID NO:68)
DP1506 1P:DP1 5060G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mUs][mU][mG][mU][mA][mG][mA][fA][fA][f A][fA][mC][mA][mA][mG][mA][mU][mA][mA] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:200)	UUGUAGAAAAACA AGAUAAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:69)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fUs][fUs][fA][fU][mC][fU][mU][mG][fU][ mU][mU][mU][fU][mC][mU][mA][mC][mA][m As][mGs][mG] (SEQ ID NO:201)	UUUAUCUUGUUUU UCUACAAGG (SEQ ID NO:70)
DP1506 3P:DP1 5062G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mGs][mU][mA][mG][mA][mA][mA][fA][fA][f C][fA][mA][mG][mA][mU][mA][mA][mU][mA] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:202)	GUAGAAAAACAAG AUAUAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:71)

	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[MeФосфонат-4O- mUs][fUs][fAs][fU][fU][mA][fU][mC][mU][fU][ mG][mU][mU][fU][mU][mU][mC][mU][mA][m Cs][mGs][mG] (SEQ ID NO:203)	UUAUUAUCUUGUU UUUCUACGG (SEQ ID NO:72)
DP1506 5P:DP1 5064G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mUs][mA][mG][mA][mA][mA][mA][fA][fC][f A][fA][mG][mA][mU][mA][mA][mU][mA][mG] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:204)	UAGAAAAACAAGA UAAUAGAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:73)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[MeФосфонат-4O- mUs][fCs][fUs][fA][fU][mU][fA][mU][mC][fU][ mU][mG][mU][fU][mU][mU][mU][mC][mU][m As][mGs][mG] (SEQ ID NO:205)	UCUAUUAUCUUGU UUUUCUAGG (SEQ ID NO:74)
DP1506 7P:DP1 5066G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mAs][mG][mA][mA][mA][mA][mA][fC][fA][f A][fG][mA][mU][mA][mA][mU][mA][mG][mC] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:206)	AGAAAAACAAGAU AAUAGCAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:75)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[MeФосфонат-4O- mUs][fGs][fCs][fU][fA][mU][fU][mA][mU][fC][ mU][mU][mG][fU][mU][mU][mU][mU][mC][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:207)	UGCUAUUAUCUUG UUUUUCUGG (SEQ ID NO:76)
DP1506 9P:DP1 5068G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mAs][mA][mA][mA][mA][mC][mA][fA][fG][f A][fU][mA][mA][mU][mA][mG][mC][mA][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:208)	AAAAACAAGAUAA UAGCAUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:77)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[MeФосфонат-4O- mUs][fAs][fUs][fG][fC][mU][fA][mU][mU][fA][ mU][mC][mU][fU][mG][mU][mU][mU][mU][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:209)	UAUGCUAUUAUCU UGUUUUUGG (SEQ ID NO:78)
DP1507 1P:DP1 5070G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem-	[mAs][mA][mC][mA][mG][mC][mA][fU][fA][f G][fU][mC][mA][mA][mA][mU][mA][mA][mA] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem	AACAGCAUAGUCA AAUAAAAGCAGCC GAAAGGCUGC

	GalNAc][adem-GalNAc][adem-GalNAc]MMMMMM	A-GalNAc][adema-GalNAc][adema-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:210)	(SEQ ID NO:79)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fUs][fUs][fU][fA][mU][fU][mU][mG][fA][ mC][mU][mA][fU][mG][mC][mU][mG][mU][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:211)	UUUUUUUUGACUA UGCUGUUGG (SEQ ID NO:80)
DP1507 3P:DP1 5072G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem-GalNAc][adem-GalNAc][adem-GalNAc]MMMMMM	[mAs][mC][mA][mG][mA][mA][mA][fU][fU][f U][fC][mU][mC][mU][mA][mU][mC][mU][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][adema-GalNAc][adema- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:212)	ACAGAAUUUCUC UAUCUUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:81)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fAs][fAs][fG][fA][mU][fA][mG][mA][fG][ mA][mA][mA][fU][mU][mU][mC][mU][mG][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:213)	UAAGAUAGAGAAA UUUCUGUGG (SEQ ID NO:82)
DP1507 5P:DP1 5074G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem-GalNAc][adem-GalNAc][adem-GalNAc]MMMMMM	[mUs][mG][mA][mA][mU][mG][mA][fA][fA][f U][fA][mA][mG][mA][mA][mA][mU][mG][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][adema-GalNAc][adema- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:214)	UGAAUGAAUAAG AAAUGUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:83)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fAs][fCs][fA][fU][mU][fU][mC][mU][fU][ mA][mU][mU][fU][mC][mA][mU][mU][mC][m As][mGs][mG] (SEQ ID NO:215)	UACAUUCUUAUU UCAUUCAGG (SEQ ID NO:84)
DP1507 7P:DP1 5076G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem-GalNAc][adem-GalNAc][adem-GalNAc]MMMMMM	[mAs][mC][mC][mC][mA][mG][mC][fA][fA][fC ][fU][mC][mU][mC][mA][mA][mG][mU][mU][ mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adema -GalNAc][adema-GalNAc][adema- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:216)	ACCCAGCAACUCU CAAGUUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:85)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fAs][fAs][fC][fU][mU][fG][mA][mG][fA][ mG][mU][mU][fG][mC][mU][mG][mG][mG][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:217)	UAACUUGAGAGUU GCUGGGUGG (SEQ ID NO:86)

DP1507 9P:DP1 5078G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mCs][mC][mC][mA][mG][mC][mA][fA][fC][fU ][fC][mU][mC][mA][mA][mG][mU][mU][mU][ mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA -GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:218)	CCCAGCAACUCUC AAGUUUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:87)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fAs][fAs][fA][fC][mU][fU][mG][mA][fG][ mA][mG][mU][fU][mG][mC][mU][mG][mG][m Gs][mGs][mG] (SEQ ID NO:219)	UAAACUUGAGAGU UGCUGGGGG (SEQ ID NO:88)
DP1508 1P:DP1 5080G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mCs][mC][mA][mG][mC][mA][mA][fC][fU][fC ][fU][mC][mA][mA][mG][mU][mU][mU][mU][ mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA -GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:220)	CCAGCAACUCUCA AGUUUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:89)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fAs][fAs][fA][fA][mC][fU][mU][mG][fA][ mG][mA][mG][fU][mU][mG][mC][mU][mG][m Gs][mGs][mG] (SEQ ID NO:221)	UAAAACUUGAGAG UUGCUGGGG (SEQ ID NO:90)
DP1508 3P:DP1 5082G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mAs][mA][mG][mA][mU][mA][mU][fA][fC][f U][fC][mC][mA][mU][mA][mG][mU][mG][mA] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:222)	AAGAUAUACUCCA UAGUGAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:91)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fUs][fCs][fA][fC][mU][fA][mU][mG][fG][ mA][mG][mU][fA][mU][mA][mU][mC][mU][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:223)	UUCACUAUGGAGU AUAUCUUGG (SEQ ID NO:92)
DP1508 5P:DP1 5084G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mAs][mU][mA][mU][mA][mC][mU][fC][fC][f A][fU][mA][mG][mU][mG][mA][mA][mG][mC] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:224)	AUAUACUCCAUG UGAAGCAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:93)

	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[MeФосфонат-4O- mUs][fGs][fCs][fU][fU][mC][fA][mC][mU][fA][ mU][mG][mG][fA][mG][mU][mA][mU][mA][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:225)	UGCUUCACUAUGG AGUAUAUGG (SEQ ID NO:94)
DP1508 7P:DP1 5086G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mUs][mA][mC][mU][mC][mC][mA][fU][fA][f G][fU][mG][mA][mA][mG][mC][mA][mA][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:226)	UACUCCAUAAGUGA AGCAAUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:95)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[MeФосфонат-4O- mUs][fAs][fUs][fU][fG][mC][fU][mU][mC][fA][ mC][mU][mA][fU][mG][mG][mA][mG][mU][m As][mGs][mG] (SEQ ID NO:227)	UAUUGCUUCACUA UGGAGUAGG (SEQ ID NO:96)
DP1508 9P:DP1 5088G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mAs][mU][mA][mG][mU][mG][mA][fA][fG][f C][fA][mA][mU][mC][mU][mA][mA][mU][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:228)	AUAGUGAAGCAAU CUAAUUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:97)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[MeФосфонат-4O- mUs][fAs][fAs][fU][fU][mA][fG][mA][mU][fU][ mG][mC][mU][fU][mC][mA][mC][mU][mA][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:229)	UAAUUAGAUUGCU UCACUAUGG (SEQ ID NO:98)
DP1509 1P:DP1 5090G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mUs][mC][mA][mA][mA][mA][mU][fG][fG][f A][fA][mG][mG][mU][mU][mA][mU][mA][mC] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:230)	UCAAAAUGGAAGG UUAUACAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:99)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFF FF{FS}{FS}{Px-MS}	[MeФосфонат-4O- mUs][fGs][fUs][fA][fU][mA][fA][mC][mC][fU][ mU][mC][mC][fA][mU][mU][mU][mU][mG][m As][mGs][mG] (SEQ ID NO:231)	UGUAUAACCUUCC AUUUUGAGG (SEQ ID NO:100)
DP1509 3P:DP1 5092G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem-	[mAs][mA][mA][mU][mG][mG][mA][fA][fG][f G][fU][mU][mA][mU][mA][mC][mU][mC][mU] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem	AAAUGGAAGGUUA UACUCUAGCAGCC GAAAGGCUGC

	GalNAc][adem-GalNAc][adem-GalNAc]MMMMMM	A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:232)	(SEQ ID NO:101)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O-mUs][fAs][fGs][fA][fG][mU][fA][mU][mA][fA][mC][mC][mU][fU][mC][mC][mA][mU][mU][mUs][mGs][mG] (SEQ ID NO:233)	UAGAGUAUAACCU UCCAUUUGG (SEQ ID NO:102)
DP1509 5P:DP1 5094G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem-GalNAc][adem-GalNAc][adem-GalNAc]MMMMMM	[mGs][mA][mA][mG][mG][mU][mU][fA][fU][fA][fC][mU][mC][mU][mA][mU][mA][mA][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:234)	GAAGGUUAUACUC UAUAAAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:103)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O-mUs][fUs][fUs][fU][fA][mU][fA][mG][mA][fG][mU][mA][mU][fA][mA][mC][mC][mU][mU][mCs][mGs][mG] (SEQ ID NO:235)	UUUUAUAGAGUAU AACCUUCGG (SEQ ID NO:104)
DP1509 7P:DP1 5096G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem-GalNAc][adem-GalNAc][adem-GalNAc]MMMMMM	[mAs][mA][mG][mG][mU][mU][mA][fU][fA][fC][fU][mC][mU][mA][mU][mA][mA][mA][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:236)	AAGGUUAUACUCU AUAAAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:105)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O-mUs][fUs][fUs][fU][fU][mA][fU][mA][mG][fA][mG][mU][mA][fU][mA][mA][mC][mC][mU][mUs][mGs][mG] (SEQ ID NO:237)	UUUUUAUAGAGUA UAACCUUGG (SEQ ID NO:106)
DP1509 9P:DP1 5098G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem-GalNAc][adem-GalNAc][adem-GalNAc]MMMMMM	[mAs][mG][mG][mU][mU][mA][mU][fA][fC][fU][fC][mU][mA][mU][mA][mA][mA][mA][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:238)	AGGUUAUACUCUA UAAAUAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:107)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O-mUs][fAs][fUs][fU][fU][mU][fA][mU][mA][fG][mA][mG][mU][fA][mU][mA][mA][mC][mC][mUs][mGs][mG] (SEQ ID NO:239)	UAUUUUAUAGAGU AUAACCUUGG (SEQ ID NO:108)

DP1510 1P:DP1 5100G	{MS}MMMMMMFF FFMMMMMMMMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mAs][mU][mU][mC][mA][mG][mA][fA][f G][fC][mU][mU][mU][mG][mA][mA][mU][mG] [mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][adem A-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:240)	AUUCAGAAAGCUU UGAAUGAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:109)
	M{MS}{MS}MMM MMFMMFMFMFM FF{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fCs][fAs][fU][fU][mC][fA][mA][mA][fG][ mC][mU][mU][fU][mC][mU][mG][mA][mA][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:241)	UCAUCAAAGCUU UCUGAAUGG (SEQ ID NO:110)
DP1343 9P:DP1 3438G	{MS}MFMMMMFM FMFFMMMMFMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mAs][mA][fA][mU][mC][mA][mA][fG][mA][f U][mU][fU][fG][mC][mU][mA][fU][mG][mU][ mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA -GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:242)	AAAUCAAGAUUUG CUAUGUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:111)
	M{MS}{MS}FMMF MFMFMMMMFMMF M{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fAs][fCs][mA][fU][mA][fG][mC][mA][m A][mA][fU][mC][fU][mU][fG][mA][mU][fU][m Us][mGs][mG] (SEQ ID NO:243)	UACAUAGCAAUC UUGAUUUGG (SEQ ID NO:112)
DP1344 3P:DP1 3442G	{MS}MFMMMMFM FMFFMMMMFMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mCs][mU][fC][mA][mA][mC][mA][fU][mA][f U][mU][fU][fG][mA][mU][mC][fA][mG][mU][ mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA -GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:244)	CUCAACAUUUUG AUCAGUAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:113)
	M{MS}{MS}FMMF MFMFMMMMFMMF M{FS}{FS}{Px-MS}	[МеФосфонат-4O- mUs][fAs][fCs][mU][fG][mA][fU][mC][mA][m A][mA][fU][mA][fU][mG][fU][mU][mG][fA][m Gs][mGs][mG] (SEQ ID NO:245)	UACUGAUCAAUA UGUUGAGGG (SEQ ID NO:114)
DP1346 5P:DP1 3464G	{MS}MFMMMMFM FMFFMMMMFMMM MMMMMMM[adem- GalNAc][adem- GalNAc][adem- GalNAc]MMMMMM	[mGs][mU][fG][mG][mA][mG][mA][fA][mA][f A][mC][fA][fA][mC][mC][mU][fA][mA][mA][m A][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA- GalNAc][ademA-GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO:246)	GUGGAGAAAACAA CCUAAAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO:115)

M{MS}{MS}FMMF MFMFMMMMMF M{FS}{FS}{Px-MS}	[MeФосфонат-4O- mUs][fUs][fUs][mU][fA][mG][fG][mU][mU][m G][mU][fU][mU][fU][mC][fU][mC][mC][fA][m Cs][mGs][mG] (SEQ ID NO:247)	UUUUAGGUUGUUU UCUCCACGG (SEQ ID NO:116)
---	---	---

В профилях модификации Таблицы А:

«М» означает 2'-ОМе модифицированный нуклеотид;

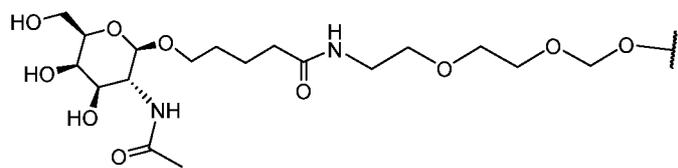
«F» означает 2'-F модифицированный нуклеотид;

«S» означает нуклеотид с 3'-фосфоротиоатной связью;

«{MS}» означает 2'-ОМе модифицированный нуклеотид с 3'-фосфоротиоатной связью;

«{FS}» означает 2'-F модифицированный нуклеотид с 3'-фосфоротиоатной связью;

«[adem-GalNAc]» означает нуклеотид, имеющий конъюгат 2'-GalNAc:



«{Px-MS}» означает 2'-ОМе модифицированный нуклеотид с 3'-фосфоротиоатной связью, и 5'-фосфонатной связью.

В модифицированных последовательностях Таблицы А:

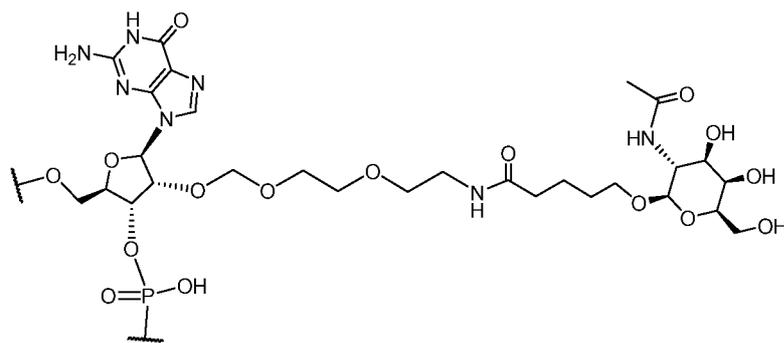
«[mN]» означает 2'-ОМе модифицированный нуклеотид;

«[fN]» означает 2'-F модифицированный нуклеотид;

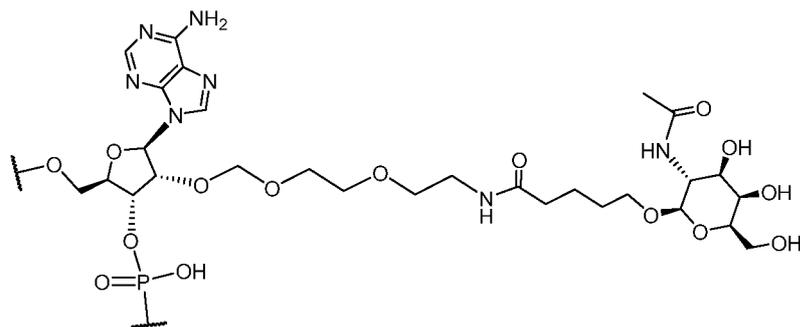
«[mNs]» означает 2'-ОМе модифицированный нуклеотид с 3'-фосфоротиоатной связью;

«[fNs]» означает 2'-F модифицированный нуклеотид с 3'-фосфоротиоатной связью;

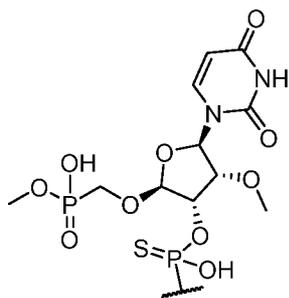
«[ademG-GalNAc]» означает нуклеотид G, имеющий конъюгат 2'-GalNAc: ;



«[ademA-GalNAc]» означает нуклеотид А, имеющий конъюгат 2'-GalNAc:



“[MeФосфонат-4О-mUs]” означает 5'-фосфонат-4'-окси-2'-ОМе уридин с 3'-фосфоротиоатной связью:



[00227] *Исследования на приматах, не относящихся к человеку (NHP)*

[00228] GalNAc-конъюгированные олигонуклеотиды ANGPTL3, перечисленные в **Таблице 4** оценивали на яванских макаках (*Macaca fascicularis*). В этом исследовании NHP группировали таким образом, чтобы их средняя масса тела (около 5,4 кг) была сопоставима между контрольной и экспериментальной группами. Каждая когорта состояла из двух самцов и трех самок. Олигонуклеотиды ANGPTL3, конъюгированные с GalNAc, вводили подкожно в День исследования 0. Образцы крови собирали в Дни исследования -8, -5 и 0 и еженедельно после введения дозы. Биоптаты, полученные в результате толстоигольной биопсии печени под ультразвуковым контролем собирали в Дни исследования 28, 56 и 84. В каждый момент времени общую РНК, полученную из образцов биопсии печени, подвергали анализу qRT-PCR для измерения мРНК ANGPTL3 в NHP, получавших олигонуклеотид, по сравнению с NHP, получавшими сопоставимый объем PBS. Для нормализации данных, измерения проводили относительно среднего геометрического двух эталонных генов, PPIB и 18S рРНК. Как продемонстрировано на **Фиг. 5А** (День 28), **Фиг. 5В** (День 56), и **Фиг. 5С** (День 84), введение в организм NHP олигонуклеотидов ANGPTL3, конъюгированных с GalNAc, перечисленных в **Таблице 4**, ингибирует экспрессию ANGPTL3 в печени, что определяется сниженным количеством мРНК ANGPTL3 в образцах печени от NHP, получавших олигонуклеотид, по сравнению с NHP, получавшими PBS. Среднее процентное снижение мРНК ANGPTL3 в образцах печени пролеченных NHP указано над набором точек данных для каждой группы лечения, а график средних значений во времени приведен на **Фиг. 6**. Во всех оцениваемых моментах времени ANGPTL3-1412 ингибировал экспрессию ANGPTL3 в большей степени, чем эталонный GalNAc-конъюгированный олигонуклеотид ANGPTL3 ANGPTL3-0327. Из того же исследования на NHP, ингибирование экспрессии ANGPTL3 также определяли путем измерения белка ANGPTL3 в сыворотке, приготовленной из образцов крови, взятых перед введением и еженедельно, с помощью ELISA. Как продемонстрировано на **Фиг. 7**, значимое снижение сывороточного белка ANGPTL3 наблюдалось у NHP, получавших GalNAc-конъюгированные олигонуклеотиды ANGPTL3, по сравнению с NHP, получавшими PBS. Значения из трех образцов до введения дозы усредняли и устанавливали за 100%, а данные представляли как относительные значения по сравнению со средним значением до введения дозы. Взятые вместе, эти результаты демонстрируют, что введение в организм NHP олигонуклеотидов ANGPTL3, конъюгированных с GalNAc, снижает количество мРНК ANGPTL3 в печени и одновременно снижает количество белка ANGPTL3 в сыворотке.

**[1]** В совокупности эти результаты демонстрируют, что GalNAc-конъюгированные олигонуклеотиды ANGPTL3, предназначенные для нацеливания на мРНК ANGPTL3 человека, ингибируют экспрессию ANGPTL3 *in vivo* (о чем свидетельствует снижение количества мРНК ANGPTL3 и белка ANGPTL3 у пролеченных животных).

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[00229] Следующие нуклеиновые и/или аминокислотные последовательности упоминаются в описании выше и представлены ниже для справки.

[00230] **Таблица 5:** Олигонуклеотидные последовательности ANGPTL3 (немодифицированные)

Олигонуклеотид	DP#	Последовательность (Смысловая цепь)	SEQ ID NO	Последовательность (Антисмысловая цепь)	SEQ ID NO
ANGPTL3-0099	DP14993P:D P14992G	AUAAAAAUGUUCACAAUU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	1	UAAAUUGUGAACAUUUUU AUGG	2
ANGPTL3-0108	DP14995P:D P14994G	UUCACAAUUAAGCUCCUU CAGCAGCCGAAAGGCUGC	3	UGAAGGAGCUUAAUUGUG AAGG	4
ANGPTL3-0111	DP14997P:D P14996G	ACAAUUAAGCUCCUUCUU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	5	UAAAGAAGGAGCUUAAUU GUGG	6
ANGPTL3-0112	DP14999P:D P14998G	CAAUUAAGCUCCUUCUUU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	7	UAAAAGAAGGAGCUUAAU UGGG	8
ANGPTL3-0143	DP15001P:D P15000G	AGUUAUUUCCUCCAGAAU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	9	UAAUUCUGGAGGAAAUAA CUGG	10
ANGPTL3-0165	DP15003P:D P15002G	CAAGACAAUUCAUCAUUU GAGCAGCCGAAAGGCUGC	11	UCAAUGAUGAAUUGUCU UGGG	12
ANGPTL3-0167	DP15005P:D P15004G	AGACAAUUCAUCAUUUGA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	13	UAUCAAAUGAUGAAUUGU CUGG	14
ANGPTL3-0170	DP15007P:D P15006G	CAAUUCAUCAUUUGAUUC UAGCAGCCGAAAGGCUGC	15	UAGAAUCAAAUGAUGAAU UGGG	16
ANGPTL3-0196	DP15009P:D P15008G	CAGAGCCAAAUCAAGAU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	17	UAAUCUUGAUUUUGGCUC UGGG	18
ANGPTL3-0197	DP15011P:D P15010G	AGAGCCAAAUCAAGAUU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	19	UAAAUCUUGAUUUUGGCU CUGG	20
ANGPTL3-0198	DP15013P:D P15012G	GAGCCAAAUCAAGAUUU GAGCAGCCGAAAGGCUGC	21	UCAAUCUUGAUUUUGGC UCGG	22
ANGPTL3-0201	DP15015P:D P15014G	CCAAAUCAAGAUUUGCU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	23	UUAGCAAUCUUGAUUUU GGGG	24
ANGPTL3-0202	DP15017P:D P15016G	CAAAAUCAAGAUUUGCUA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	25	UAUAGCAAUCUUGAUUU UGGG	26
ANGPTL3-0203	DP15019P:D P15018G	AAAAUCAAGAUUUGCUAU GAGCAGCCGAAAGGCUGC	27	UCAUAGCAAUCUUGAUU UUGG	28
ANGPTL3-0212	DP15021P:D P15020G	AUUUGCUAUGUUAGACGA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	29	UAUCGUCUACAUAAGCAA AUGG	30
ANGPTL3-0303	DP15023P:D P15022G	CAAAUUAUGACAUUUU CAGCAGCCGAAAGGCUGC	31	UGAAAUUGUCAUUAAUU UGGG	32

ANGPTL3-0310	DP15025P:D P15024G	AUGACAUUUUCAAAAAC UAGCAGCCGAAAGGCUGC	33	UAGUUUUUGAAAUUGUC AUGG	34
ANGPTL3-0330	DP15027P:D P15026G	AACAUUUUGAUCAGUCU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	35	UAAGACUGAUCAAAUAUG UUGG	36
ANGPTL3-0332	DP15029P:D P15028G	CAUAAUUUGAUCAGUCUUU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	37	UAAAAGACUGAUCAAAUA UGGG	38
ANGPTL3-0333	DP15031P:D P15030G	AUAAUUUGAUCAGUCUUUU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	39	UAAAAGACUGAUCAAAUA AUGG	40
ANGPTL3-0337	DP15033P:D P15032G	UUGAUCAGUCUUUUUAUG AAGCAGCCGAAAGGCUGC	41	UUCAUAAAAGACUGAUC AAGG	42
ANGPTL3-0394	DP15035P:D P15034G	AGGAACUGAGAAGAACUA CAGCAGCCGAAAGGCUGC	43	UGUAGUUCUUCUCAGUUC CUGG	44
ANGPTL3-0396	DP15037P:D P15036G	GAACUGAGAAGAACUACA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	45	UAUGUAGUUCUUCUCAGU UCGG	46
ANGPTL3-0400	DP15039P:D P15038G	UGAGAAGAACUACAUUA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	47	UUUAUAUGUAGUUCUUCU CAGG	48
ANGPTL3-0401	DP15041P:D P15040G	GAGAAGAACUACAUUAA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	49	UUUAUAUGUAGUUCUUC UCGG	50
ANGPTL3-0437	DP15043P:D P15042G	AGAGGUAAAAGAAUUGUC AAGCAGCCGAAAGGCUGC	51	UUGACAUAUUCUUUACCU CUGG	52
ANGPTL3-0447	DP15045P:D P15044G	AAUUGUCACUUGAACUC AAGCAGCCGAAAGGCUGC	53	UUGAGUUCAAGUGACAU UUGG	54
ANGPTL3-0517	DP15047P:D P15046G	UGAAAUUUUAGAAGAGC AAGCAGCCGAAAGGCUGC	55	UUGCUCUUCUAAAUAUUU CAGG	56
ANGPTL3-0518	DP15049P:D P15048G	GAAAUUUUAGAAGAGCA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	57	UUUGCUCUUCUAAAUAUU UCGG	58
ANGPTL3-0532	DP15051P:D P15050G	AGCAACUAACUAAUUA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	59	UAUUAAGUUAGUUAGUU GCUGG	60
ANGPTL3-0541	DP15053P:D P15052G	CUAACUAAUUCAAAUC AAGCAGCCGAAAGGCUGC	61	UUGAUUUUGAAUUAAGU UAGGG	62
ANGPTL3-0582	DP15055P:D P15054G	GAAGUAACUUCACUAAA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	63	UUUUUAAGUGAAGUUACU UCGG	64
ANGPTL3-0602	DP15057P:D P15056G	UUUUGUAGAAAAACAAGA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	65	UAUCUUGUUUUUCUACAA AAGG	66
ANGPTL3-0603	DP15059P:D P15058G	UUUGUAGAAAAACAAGAU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	67	UAUCUUGUUUUUCUACA AAGG	68
ANGPTL3-0604	DP15061P:D P15060G	UUGUAGAAAAACAAGUA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	69	UUUAUCUUGUUUUUCUAC AAGG	70
ANGPTL3-0606	DP15063P:D P15062G	GUAGAAAAACAAGUAAU AAGCAGCCGAAAGGCUGC	71	UAUUAUCUUGUUUUUCU ACGG	72

ANGPTL3-0607	DP15065P:D P15064G	UAGAAAAACAAGAUAAUA GAGCAGCCGAAAGGCUGC	73	UCUAUUAUCUUGUUUUUC UAGG	74
ANGPTL3-0608	DP15067P:D P15066G	AGAAAAACAAGAUAAUAG CAGCAGCCGAAAGGCUGC	75	UGCUAUUAUCUUGUUUUU CUGG	76
ANGPTL3-0610	DP15069P:D P15068G	AAAAACAAGAUAAUAGCA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	77	UAUGCUAUUAUCUUGUUU UUGG	78
ANGPTL3-0676	DP15071P:D P15070G	AACAGCAUAGUCAAAUAA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	79	UUUUUUUUGACUAUGCUG UUGG	80
ANGPTL3-0738	DP15073P:D P15072G	ACAGAAUUUCUCUAUCU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	81	UAAGAUAGAGAAAUUUCU GUGG	82
ANGPTL3-0796	DP15075P:D P15074G	UGAAUGAAAUAAGAAU GUAGCAGCCGAAAGGCUG C	83	UACAUUUCUUUUUCAU CAGG	84
ANGPTL3-0893	DP15077P:D P15076G	ACCCAGCAACUCUCAAGU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	85	UAACUUGAGAGUUGCUGG GUGG	86
ANGPTL3-0894	DP15079P:D P15078G	CCCAGCAACUCUCAAGUU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	87	UAAACUUGAGAGUUGCUG GGGG	88
ANGPTL3-0895	DP15081P:D P15080G	CCAGCAACUCUCAAGUUU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	89	UAAAACUUGAGAGUUGCU GGGG	90
ANGPTL3-1059	DP15083P:D P15082G	AAGAUUACUCCAUAUGUG AAGCAGCCGAAAGGCUGC	91	UUCACUAUGGAGUAUAUC UUGG	92
ANGPTL3-1062	DP15085P:D P15084G	AUAUACUCCAUAUGUGAAG CAGCAGCCGAAAGGCUGC	93	UGCUUCACUAUGGAGUAU AUGG	94
ANGPTL3-1065	DP15087P:D P15086G	UACUCCAUAUGUGAAGCAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	95	UAUUGCUUCACUAUGGAG UAGG	96
ANGPTL3-1071	DP15089P:D P15088G	AUAGUGAAGCAAUCUAAU UAGCAGCCGAAAGGCUGC	97	UAAUUAGAUUGCUUCACU AUGG	98
ANGPTL3-1412	DP15091P:D P15090G	UCAAAAUGGAAGGUUAUA CAGCAGCCGAAAGGCUGC	99	UGUAUAACCUUCCAUUUU GAGG	100
ANGPTL3-1415	DP15093P:D P15092G	AAAUGGAAGGUUAUACUC UAGCAGCCGAAAGGCUGC	101	UAGAGUAUAACCUUCCA UUGG	102
ANGPTL3-1420	DP15095P:D P15094G	GAAGGUUAUACUCUAUAA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	103	UUUUUAUAGAGUAUAACCU UCGG	104
ANGPTL3-1421	DP15097P:D P15096G	AAGGUUAUACUCUAUAAA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	105	UUUUUAUAGAGUAUAACC UUGG	106
ANGPTL3-1422	DP15099P:D P15098G	AGGUUAUACUCUAUAAAA UAGCAGCCGAAAGGCUGC	107	UAUUUUUAUAGAGUAUAAC CUGG	108
ANGPTL3-1468	DP15101P:D P15100G	AUUCAGAAAGCUUUGAAU GAGCAGCCGAAAGGCUGC	109	UCAUCAAAGCUUUCUGA AUGG	110

ANGPTL3-0204	DP13439P:D P13438G	AAAUCAAGAUUUGCUAUG UAGCAGCCGAAAGGCUGC	111	UACAUAGCAAUCUUGAU UUGG	112
ANGPTL3-0327	DP13443P:D P13442G	CUCAACAUAUUUGAUCAG UAGCAGCCGAAAGGCUGC	113	UACUGAUCAAAUAUGUUG AGGG	114
ANGPTL3-1327	DP13465P:D P13464G	GUGGAGAAAACAACCUAA AAGCAGCCGAAAGGCUGC	115	UUUUAGGUUGUUUCUCC ACGG	116

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Олигонуклеотид для снижения экспрессии ANGPTL3 (англ.: angiotensin-like protein 3 – рус.: ангиопозитинподобный белок 3), при этом указанный олигонуклеотид содержит антисмысловую цепь, содержащую последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114 и 116.
2. Олигонуклеотид по п. 1, содержащий смысловую цепь, содержащую последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113 и 115.
3. Олигонуклеотид по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что антисмысловая цепь содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 100, 102, 104, 20, 26, 50, 72, 74, 76, 80 и 114.
4. Олигонуклеотид по п. 2 или п. 3, отличающийся тем, что смысловая цепь содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 99, 101, 103, 19, 25, 49, 71, 73, 75, 79 и 113.
5. Олигонуклеотид для снижения экспрессии ANGPTL3, содержащий антисмысловую цепь длиной от 15 до 30 нуклеотидов и смысловую цепь длиной от 15 до 40 нуклеотидов, при этом указанная антисмысловая цепь имеет область комплементарности к целевой последовательности ANGPTL3, как указано в любой из SEQ ID NO: 125, 126, 127, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124 и 117, при этом область комплементарности имеет длину по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов.
6. Олигонуклеотид по п. 5, отличающийся тем, что область комплементарности полностью комплементарна целевой последовательности ANGPTL3.
7. Олигонуклеотид по любому из пп. 1–6, отличающийся тем, что длина антисмысловой цепи составляет от 19 до 27 нуклеотидов.
8. Олигонуклеотид по любому из пп. 1–7, отличающийся тем, что длина антисмысловой цепи составляет от 21 до 27 нуклеотидов, необязательно при этом длина антисмысловой цепи составляет 22 нуклеотида.
9. Олигонуклеотид по любому из пп. 2–8, отличающийся тем, что смысловая цепь образует дуплексную область с антисмысловой цепью.
10. Олигонуклеотид по п. 9, отличающийся тем, что длина смысловой цепи составляет от 19 до 40 нуклеотидов, необязательно при этом длина смысловой цепи составляет 36 нуклеотидов.
11. Олигонуклеотид по п. 9 или п. 10, отличающийся тем, что дуплексная область имеет длину по меньшей мере 19 нуклеотидов.

12. Олигонуклеотид по любому из пп. 9–11, отличающийся тем, что длина дуплексной области составляет по меньшей мере 21 нуклеотид, необязательно при этом длина дуплексной области составляет 20 нуклеотидов.
13. Олигонуклеотид по любому из пп. 5–12, отличающийся тем, что область комплементарности к ANGPTL3 имеет длину по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов.
14. Олигонуклеотид по любому из пп. 5–13, отличающийся тем, что область комплементарности к ANGPTL3 имеет длину по меньшей мере 21 смежный нуклеотид.
15. Олигонуклеотид по любому из пп. 5–14, отличающийся тем, что антисмысловая цепь содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114 и 116.
16. Олигонуклеотид по любому из пп. 5–15, отличающийся тем, что смысловая цепь содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113 и 115.
17. Олигонуклеотид по любому из пп. 5–16, отличающийся тем, что антисмысловая цепь содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 100, 102, 104, 20, 26, 50, 72, 74, 76, 80 и 114.
18. Олигонуклеотид по любому из пп. 5–17, отличающийся тем, что смысловая цепь содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 99, 101, 103, 19, 25, 49, 71, 73, 75, 79 и 113.
19. Олигонуклеотид по любому из пп. 2–18, отличающийся тем, что смысловая цепь содержит на своем 3'-конце структуру «стебель-петля», указанную как: S1-L-S2, при этом S1 комплементарен S2, и при этом L образует петлю между S1 и S2 длиной от 3 до 5 нуклеотидов.
20. Олигонуклеотид для снижения экспрессии ANGPTL3, содержащий антисмысловую цепь и смысловую цепь,  
при этом антисмысловая цепь имеет длину от 21 до 27 нуклеотидов и имеет область комплементарности к ANGPTL3, при этом смысловая цепь содержит на своем 3'-конце структуру «стебель-петля», указанную как: S1-L-S2, при этом S1 комплементарен S2, и при этом L образует петлю между S1 и S2 длиной от 3 до 5 нуклеотидов, и  
при этом антисмысловая цепь и смысловая цепь образуют дуплексную структуру длиной по меньшей мере 19 нуклеотидов, но не связаны ковалентно.
21. Олигонуклеотид по п. 20, отличающийся тем, что область комплементарности полностью комплементарна по меньшей мере 19 смежным нуклеотидам мРНК ANGPTL3.

22. Олигонуклеотид по любому из пп. 19–21, отличающийся тем, что L представляет собой тетрапетлю.
23. Олигонуклеотид по любому из пп. 19–22, отличающийся тем, что длина L составляет 4 нуклеотида.
24. Олигонуклеотид по любому из пп. 19–23, отличающийся тем, что L содержит последовательность, обозначенную как GAAA.
25. Олигонуклеотид по любому из пп. 5–24, отличающийся тем, что длина антисмысловой цепи составляет 27 нуклеотидов, а длина смысловой цепи составляет 25 нуклеотидов, необязательно при этом длина антисмысловой цепи составляет 22 нуклеотида, а длина смысловой цепи составляет 36 нуклеотидов.
26. Олигонуклеотид по п. 25, отличающийся тем, что антисмысловая цепь и смысловая цепь образуют дуплексную область длиной 25 нуклеотидов, необязательно длина дуплекса составляет 20 нуклеотидов.
27. Олигонуклеотид по любому из пп. 20–24, содержащий 3'-липкую последовательность на антисмысловой цепи длиной 2 нуклеотида.
28. Олигонуклеотид по любому из пп. 9–18, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, каждая из которых имеет длину в диапазоне от 21 до 23 нуклеотидов.
29. Олигонуклеотид по п. 28, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид содержит дуплексную структуру длиной от 19 до 21 нуклеотида.
30. Олигонуклеотид по п. 28 или п. 29, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид содержит 3'-липкую последовательность длиной в один или большее количество нуклеотидов, при этом 3'-липкая последовательность присутствует на антисмысловой цепи, смысловой цепи или антисмысловой цепи и смысловой цепи.
31. Олигонуклеотид по п. 28 или п. 29, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид содержит 3'-липкую последовательность с длиной 2 нуклеотида, при этом 3'-липкая последовательность находится на антисмысловой цепи, и при этом смысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид, а антисмысловая цепь имеет длину 23 нуклеотида, так что смысловая цепь и антисмысловая цепь образуют дуплекс длиной 21 нуклеотид.
32. Олигонуклеотид по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.
33. Олигонуклеотид по п. 32, отличающийся тем, что указанный модифицированный нуклеотид содержит 2'-модификацию.

34. Олигонуклеотид по п. 33, отличающийся тем, что указанная 2'-модификация представляет собой модификацию, выбранную из 2'-аминоэтила, 2'-фтора, 2'-О-метила, 2'-О-метоксиэтила и 2'-дезоксид-2'-фтор-β-d-арабинонуклеиновой кислоты.
35. Олигонуклеотид по любому из пп. 32–34, отличающийся тем, что все нуклеотиды олигонуклеотида модифицированы.
36. Олигонуклеотид по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеотидную связь.
37. Олигонуклеотид по п. 36, отличающийся тем, что по меньшей мере одна межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь.
38. Олигонуклеотид по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что 4'-углерод сахара 5'-нуклеотида антисмысловой цепи содержит аналог фосфата.
39. Олигонуклеотид по п. 38, отличающийся тем, что аналог фосфата представляет собой оксиметилфосфонат, винилфосфонат или малонилфосфонат.
40. Олигонуклеотид по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что по меньшей мере один нуклеотид олигонуклеотида конъюгирован с одним или большим количеством нацеливающих лигандов.
41. Олигонуклеотид по п. 40, отличающийся тем, что каждый нацеливающий лиганд содержит углевод, аминсахар, холестерин, полипептид или липид.
42. Олигонуклеотид по п. 40, отличающийся тем, что каждый нацеливающий лиганд содержит фрагмент N-ацетилгалактозамина (GalNAc – англ.: N-acetylgalactosamine).
43. Олигонуклеотид по п. 42, отличающийся тем, что фрагмент GalNAc включает моновалентный фрагмент GalNAc, двухвалентный фрагмент GalNAc, трехвалентный фрагмент GalNAc или четырехвалентный фрагмент GalNAc.
44. Олигонуклеотид по любому из пп. 19–24, отличающийся тем, что каждый из 4 нуклеотидов L структуры «стебель-петля» конъюгирован с моновалентным фрагментом GalNAc.
45. Олигонуклеотид по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанный олигонуклеотид представляет собой олигонуклеотид РНКи.
46. Фармацевтическая композиция, содержащая олигонуклеотид по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель, агент доставки или эксципиент.

47. Способ доставки олигонуклеотида субъекту, включающий введение указанному субъекту фармацевтической композиции по п. 46.
48. Способ снижения экспрессии ANGPTL3 в клетке, популяции клеток или в организме субъекта, включающий этап:
- i. приведение в контакт клетки или популяции клеток с олигонуклеотидом по любому из пп. 1–45 или фармацевтической композицией по п. 46; или
  - ii. введение субъекту олигонуклеотида по любому из пп. 1–45 или фармацевтической композиции по п. 46.
49. Способ по п. 48, отличающийся тем, что снижение экспрессии ANGPTL3 включает снижение количества или уровня мРНК ANGPTL3, количества или уровня белка ANGPTL3 или того и другого.
50. Способ снижения количества или уровня триглицеридов (TG) у субъекта, включающий введение субъекту олигонуклеотида по любому из пп. 1–45 или фармацевтической композиции по п. 46.
51. Способ снижения количества или уровня холестерина у субъекта, включающий введение субъекту олигонуклеотида по любому из пп. 1–45 или фармацевтической композиции по п. 46.
52. Способ по любому из пп. 48–51, отличающийся тем, что у субъекта имеется заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с ANGPTL3.
53. Способ лечения субъекта, имеющего заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества олигонуклеотида по любому из пп. 1–45 или фармацевтической композиции по п. 46, тем самым осуществляя лечение указанного субъекта.
54. Способ лечения субъекта, имеющего заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества олигонуклеотида, содержащего смысловую цепь длиной от 15 до 50 нуклеотидов и антисмысловую цепь длиной от 15 до 30 нуклеотидов, при этом смысловая цепь образует дуплексную область с антисмысловой цепью, при этом смысловая цепь содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113 и 115, и при этом антисмысловая цепь содержит комплементарную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114 и 116, или его фармацевтической композиции, тем самым осуществляя лечение указанного субъекта.
55. Способ лечения субъекта, страдающего заболеванием, нарушением или патологическим состоянием, ассоциированным с экспрессией ANGPTL3, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества олигонуклеотида, содержащего пару смысловой и антисмысловой цепей,

выбранных из ряда, представленного в **Таблице 5**, или его фармацевтической композиции, тем самым осуществляя лечение указанного субъекта.

56. Способ по любому из пп. 52–55, отличающийся тем, что заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, выбрано из группы, состоящей из гипертриглицеридемии, ожирения, гиперлипидемии, нарушенного метаболизма липидов и/или холестерина, атеросклероза, сахарного диабета II типа, заболевания сердечно-сосудистой системы, коронарной болезни сердца, неалкогольного стеатогепатита (NASH), неалкогольной жировой болезни печени, гомозиготной и гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии и статин-резистентной гиперхолестеринемии.

57. Способ по п. 56, отличающийся тем, что заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, представляет собой заболевание сердечно-сосудистой системы, сахарный диабет II типа, гипертриглицеридемию, NASH, ожирение или их комбинацию.

58. Способ по любому из пп. 53–57, отличающийся тем, что олигонуклеотид или фармацевтическую композицию вводят в комбинации со второй композицией или терапевтическим агентом.

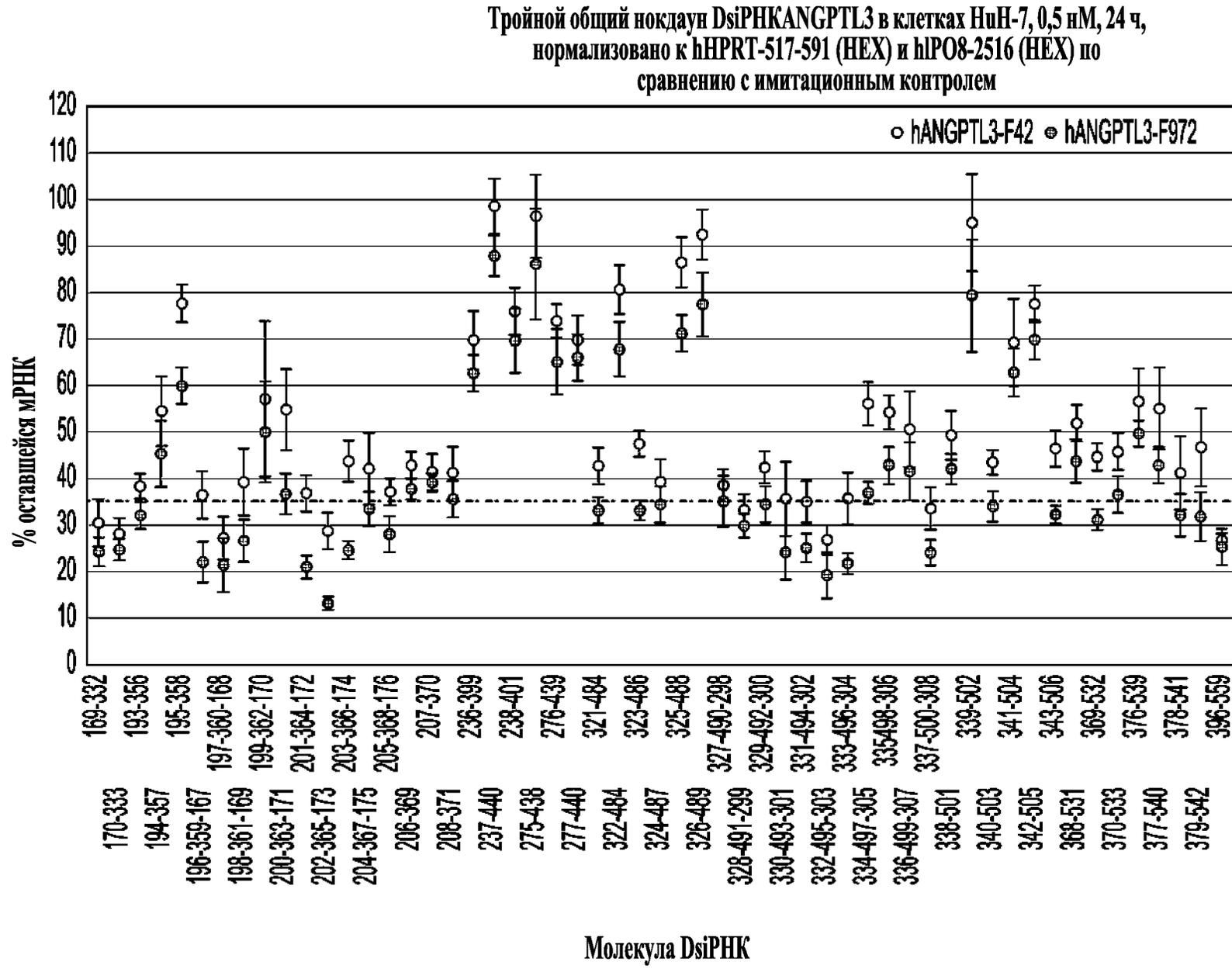
59. Применение олигонуклеотида по любому из пп. 1–45 или фармацевтической композиции по п. 46 в изготовлении лекарственного препарата для лечения заболевания, нарушения или патологического состояния, ассоциированного с экспрессией ANGPTL3.

60. Олигонуклеотид по любому из пп. 1–45 или фармацевтическая композиция по п. 46, предназначены для применения или адаптированы для применения при лечении заболевания, нарушения или патологического состояния, ассоциированного с экспрессией ANGPTL3.

61. Набор, содержащий олигонуклеотид по любому из пп. 1–45, необязательный фармацевтически приемлемый носитель и вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению субъекту, имеющему заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3.

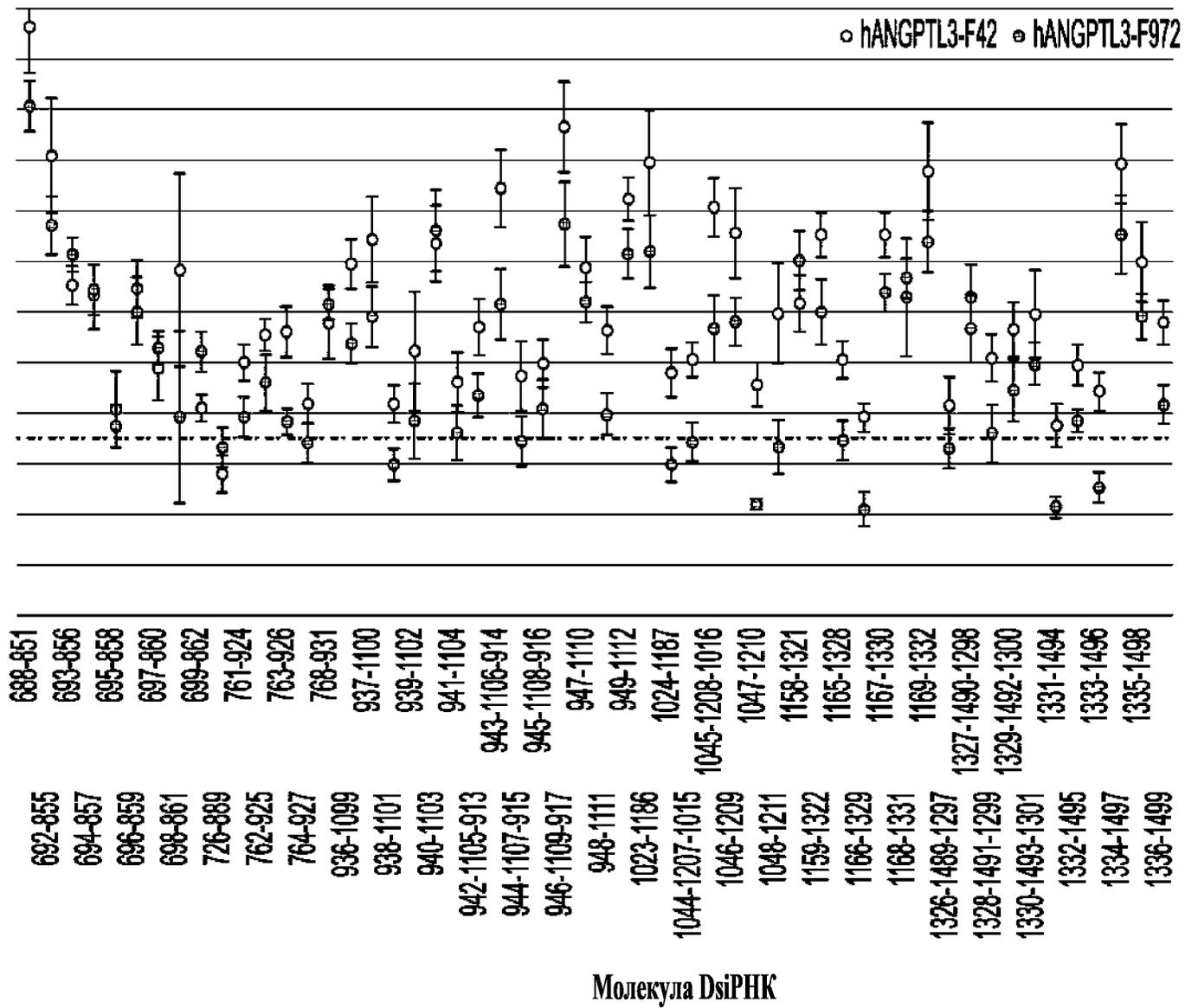
62. Применение по п. 59, олигонуклеотид или фармацевтическая композиция для применения по п. 60 или набор по п. 61, отличающиеся тем, что заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, выбрано из группы, состоящей из гипертриглицеридемии, ожирения, гиперлипидемии, нарушенного метаболизма липидов и/или холестерина, атеросклероза, сахарного диабета II типа, заболевания сердечно-сосудистой системы, коронарной болезни сердца, неалкогольного стеатогепатита (NASH), неалкогольной жировой болезни печени, гомозиготной и гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии и статин-резистентной гиперхолестеринемии.

63. Применение по п. 59, олигонуклеотид или фармацевтическая композиция для применения по п. 60 или набор по п. 61, отличающиеся тем, что заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с экспрессией ANGPTL3, представляет собой заболевание сердечно-сосудистой системы, сахарный диабет II типа, гипертриглицеридемию, NASH, ожирение или их комбинацию.



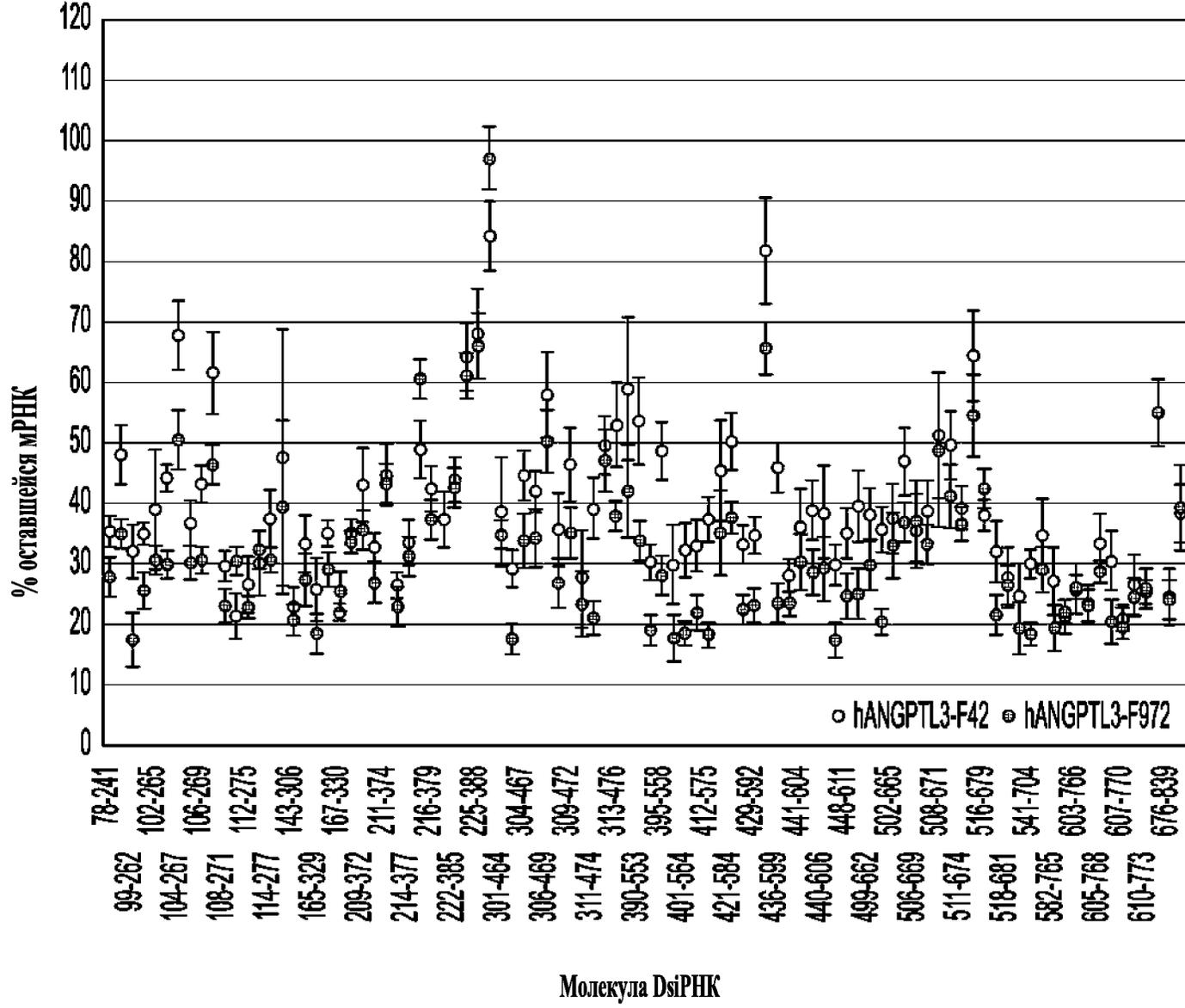
Фиг. 1

Тройной общий нокаун DsiRNAKPTL3 в клетках HuH-7, 0,5 нМ, 24 ч,  
 нормализовано к hHPRT-517-591 (HEX) и hPO8-2516 (HEX) по  
 сравнению с имитационным контролем



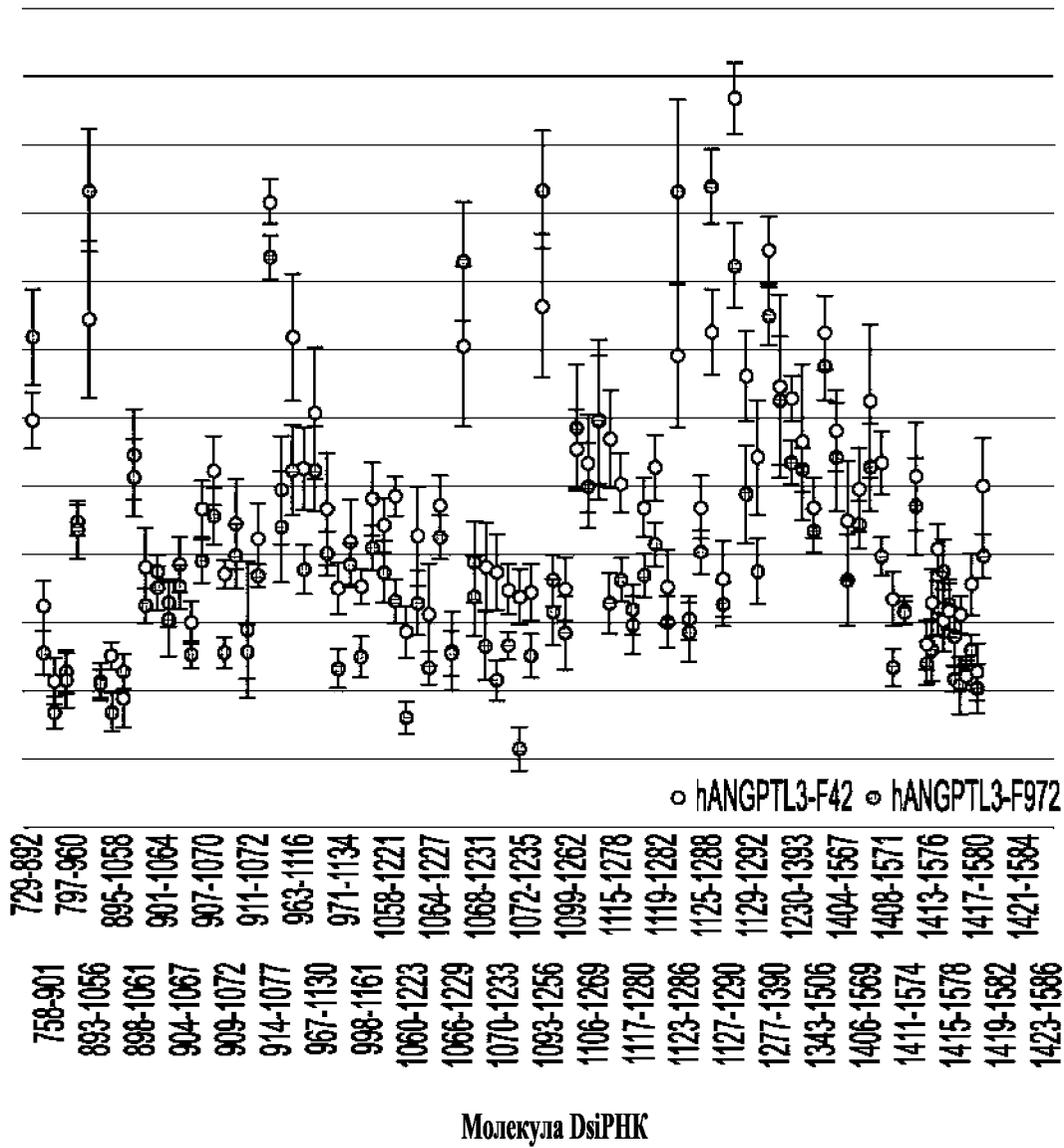
Фиг. 1 (продолж.)

Нокдаун ANGPTL3 «человека-обезьяна» в клетках HuH-7, 0,5 нМ, 24 ч,  
 нормализовано к hHPRT-517-591 (HEX) и hPO8-2516 (HEX) по сравнению с  
 имитационным контролем



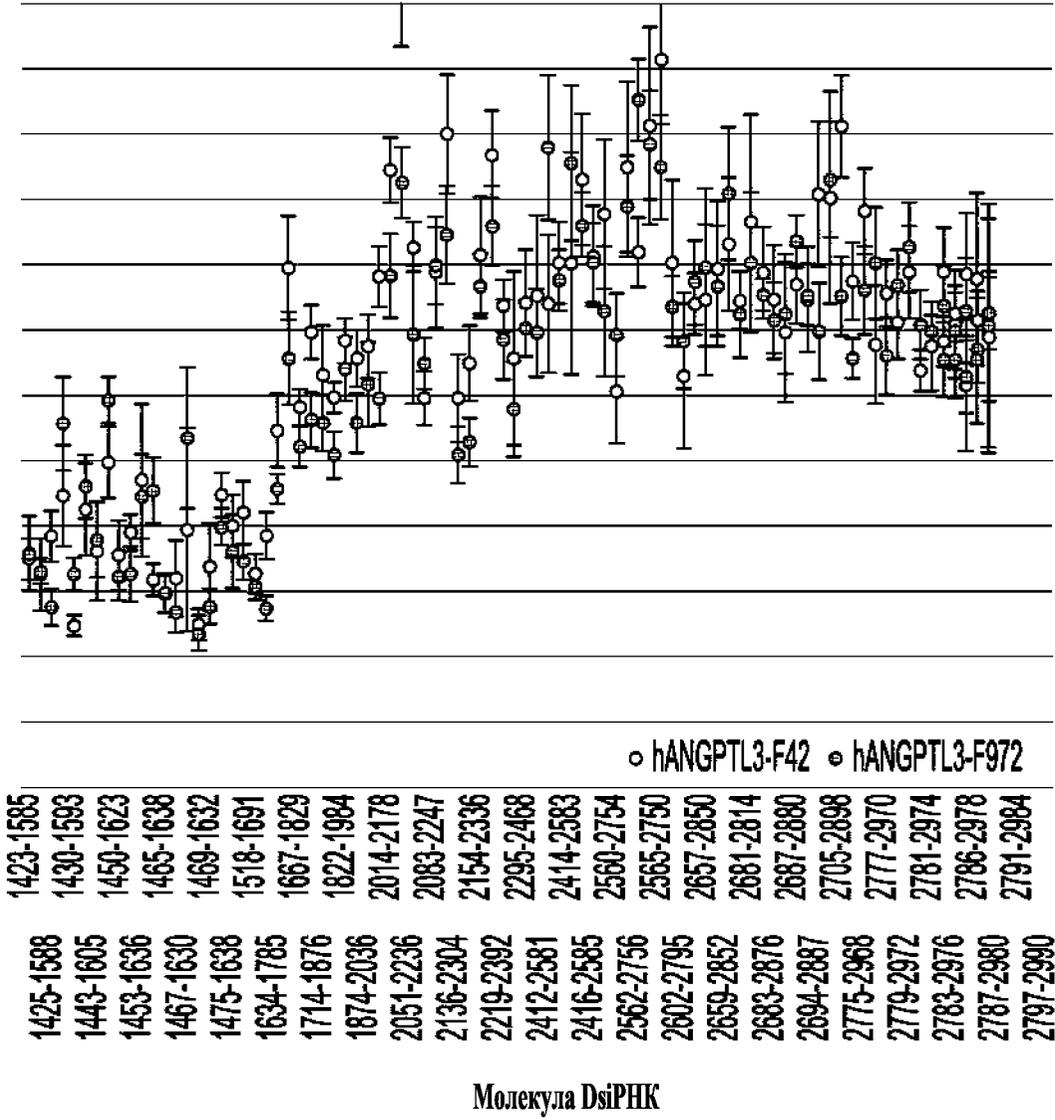
Фиг. 2

Нокдаун ANGPTL3 «человека-обезьяна» в клетках HuH-7, 0,5 нМ, 24 ч, нормализовано к hPRT-517-591 (HEX) и hPO8-2516 (HEX) по сравнению с имитационным контролем

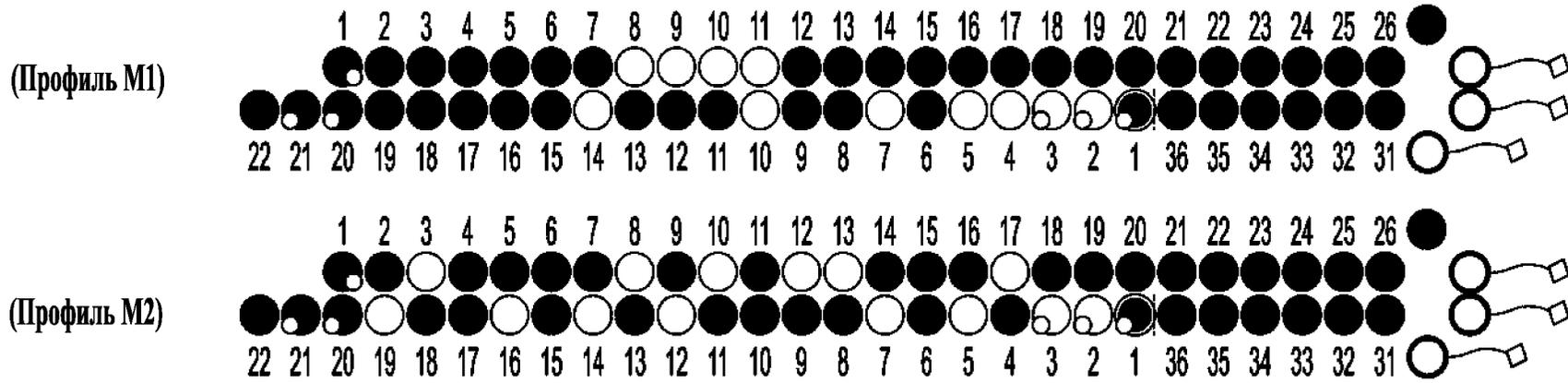


Фиг. 2 (продолж.)

Покдаун ANGPTL3 «человека-обезьяна» в клетках HuH-7, 0,5 нМ, 24 ч, нормализовано к hHPRT-517-591 (HEX) и hPO8-2516 (HEX) по сравнению с имитационным контролем



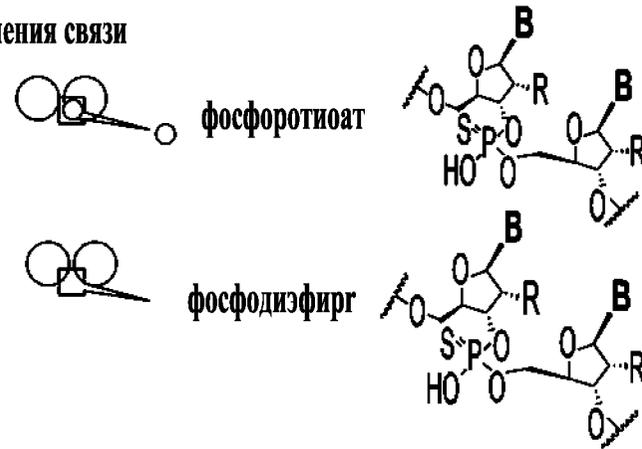
Фиг. 2 (продолж.)



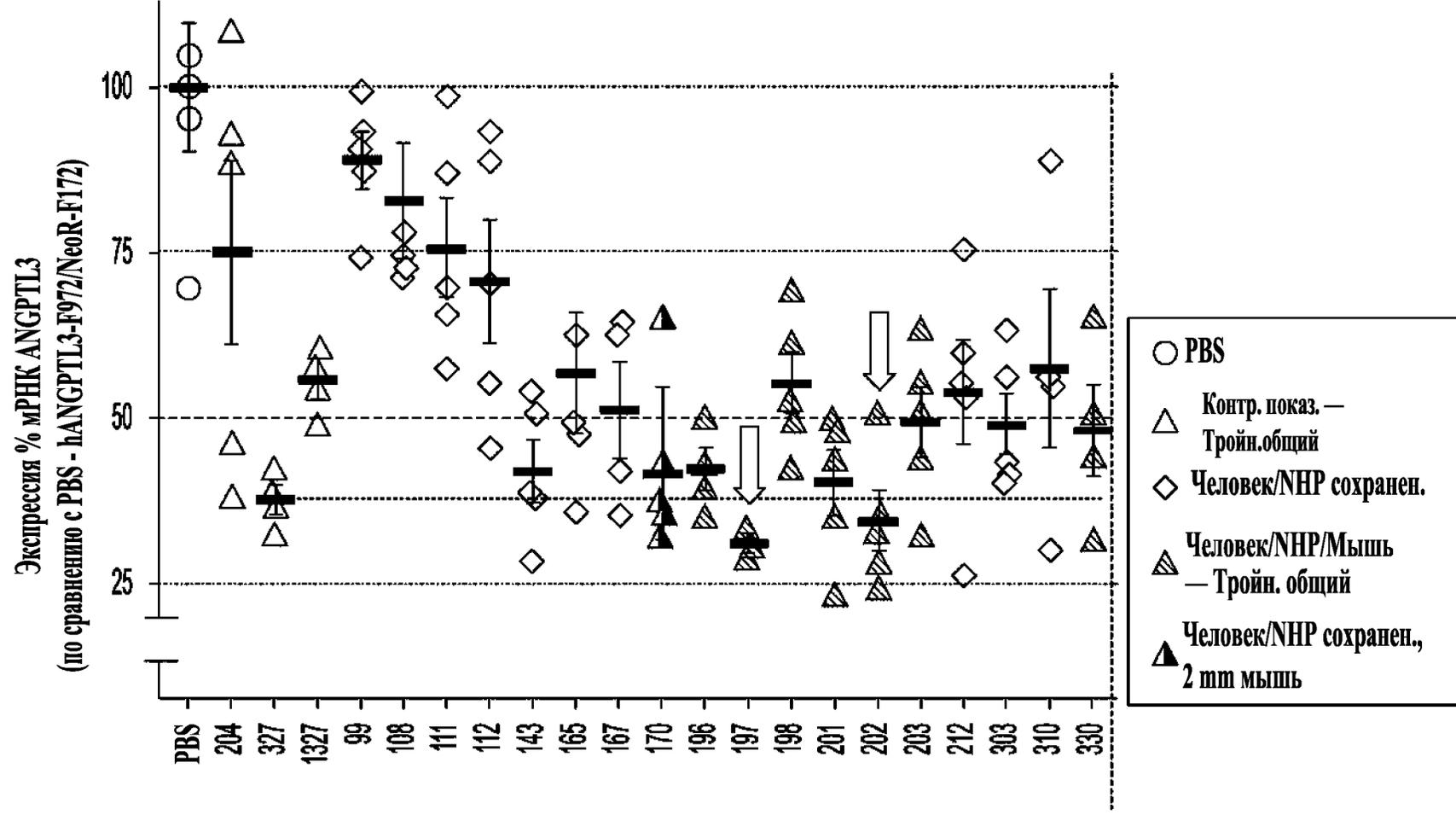
Обозначения

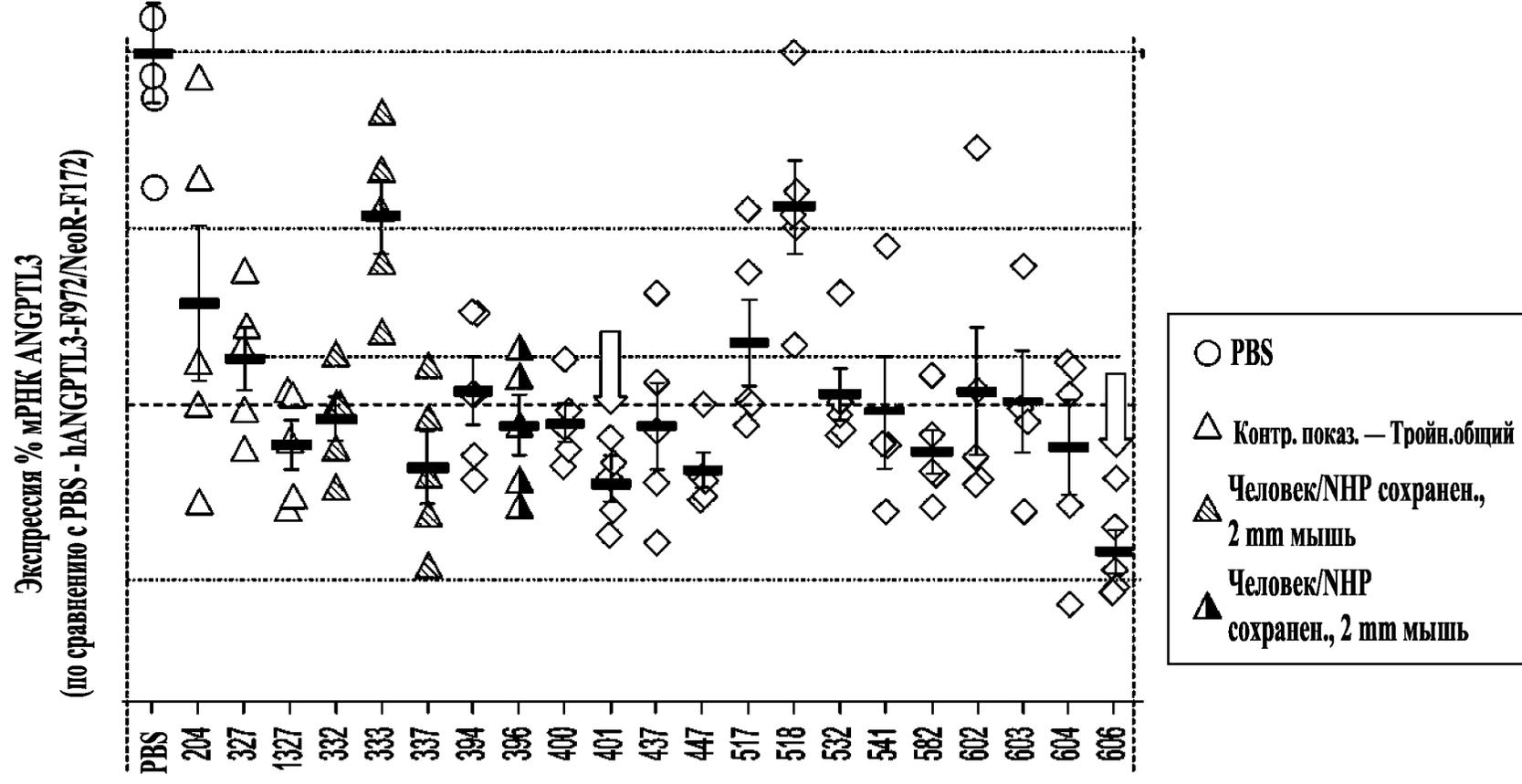
- 2'-OMe
- 2'-F
- GalNAc conjugated nucleotide
- 1 2 Числовые метки: положения нуклеотидов от 5'-конца до 3'-конца для каждой цепи
- ⋮ тетрапегля с разрывом
- тиофосфатная связь
- нуклеоснование с миметиком 5'-фосфата на нуклеотиде (2'-OMe)

Обозначения связи

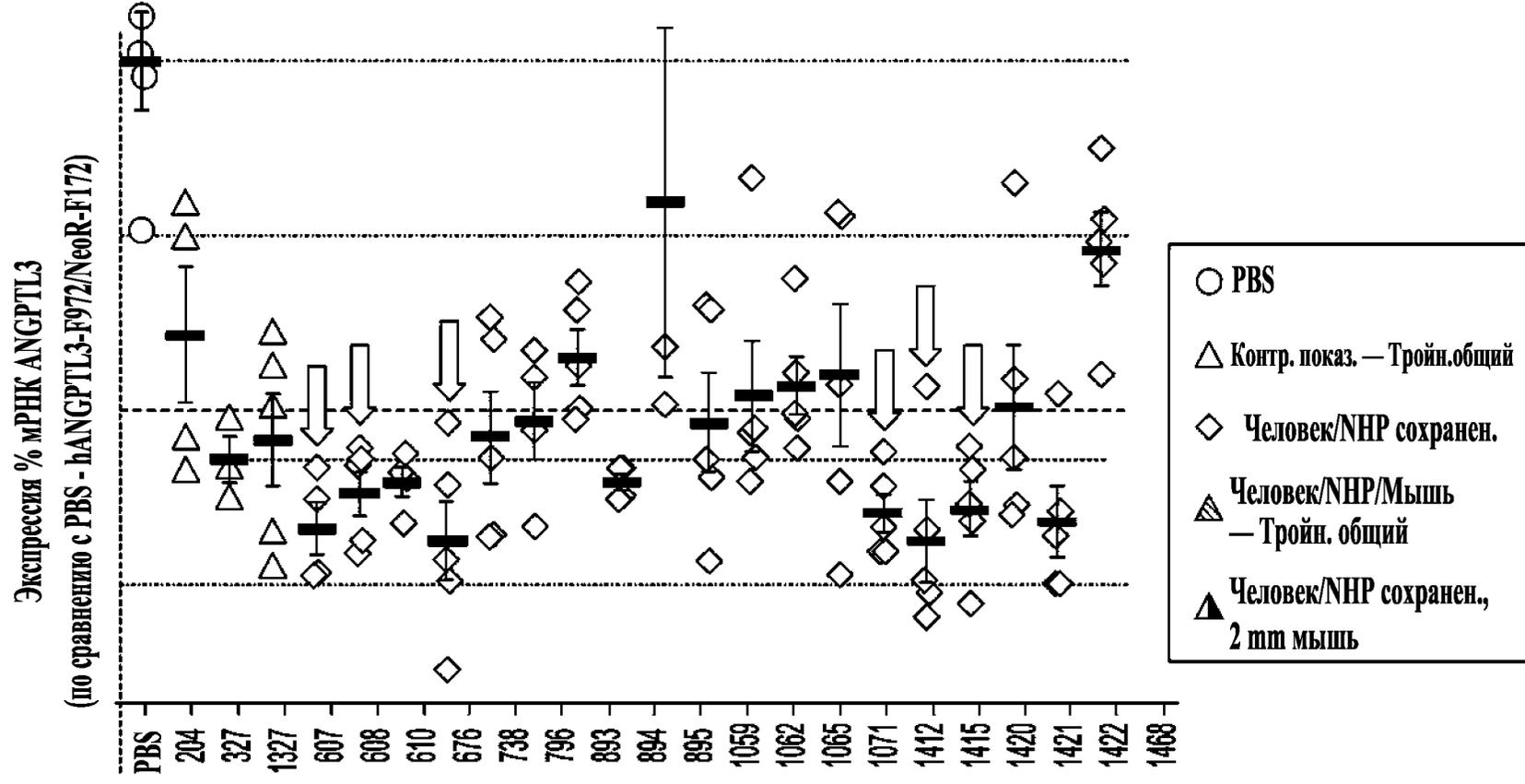


Фиг. 3



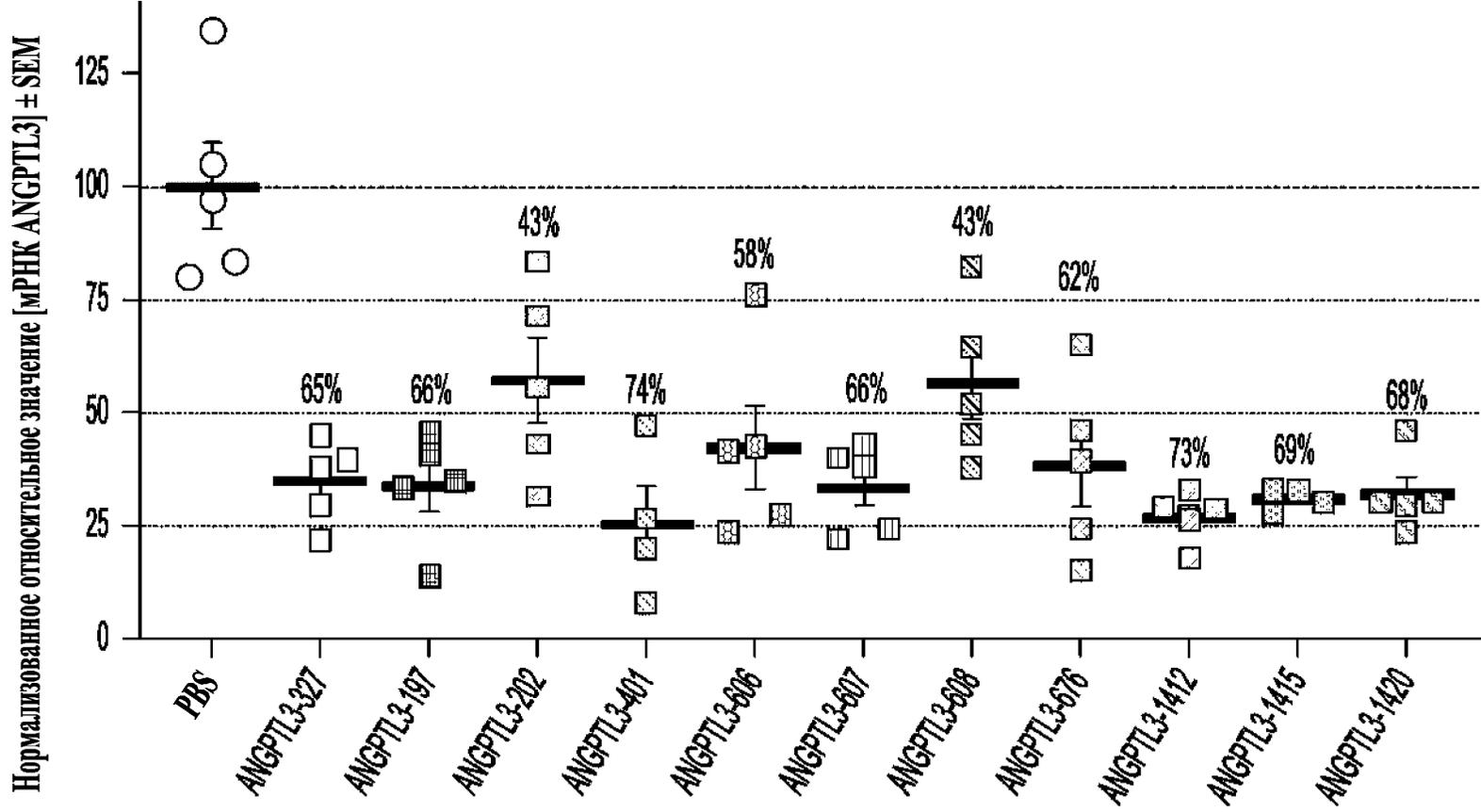


**In Vivo скринирование, группа В  
Фиг. 4 (продолж.)**

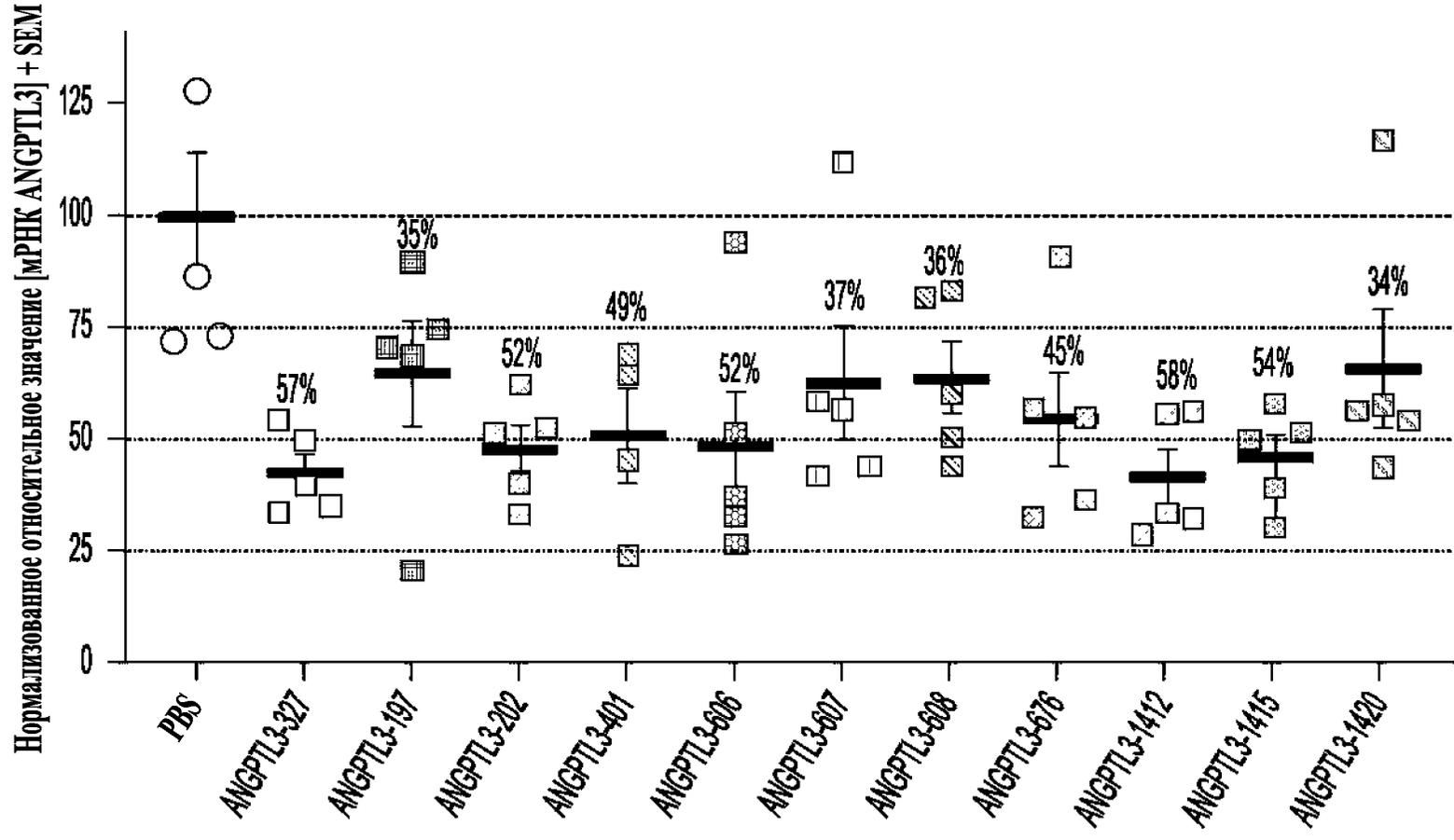


In Vivo скринирование, группа С

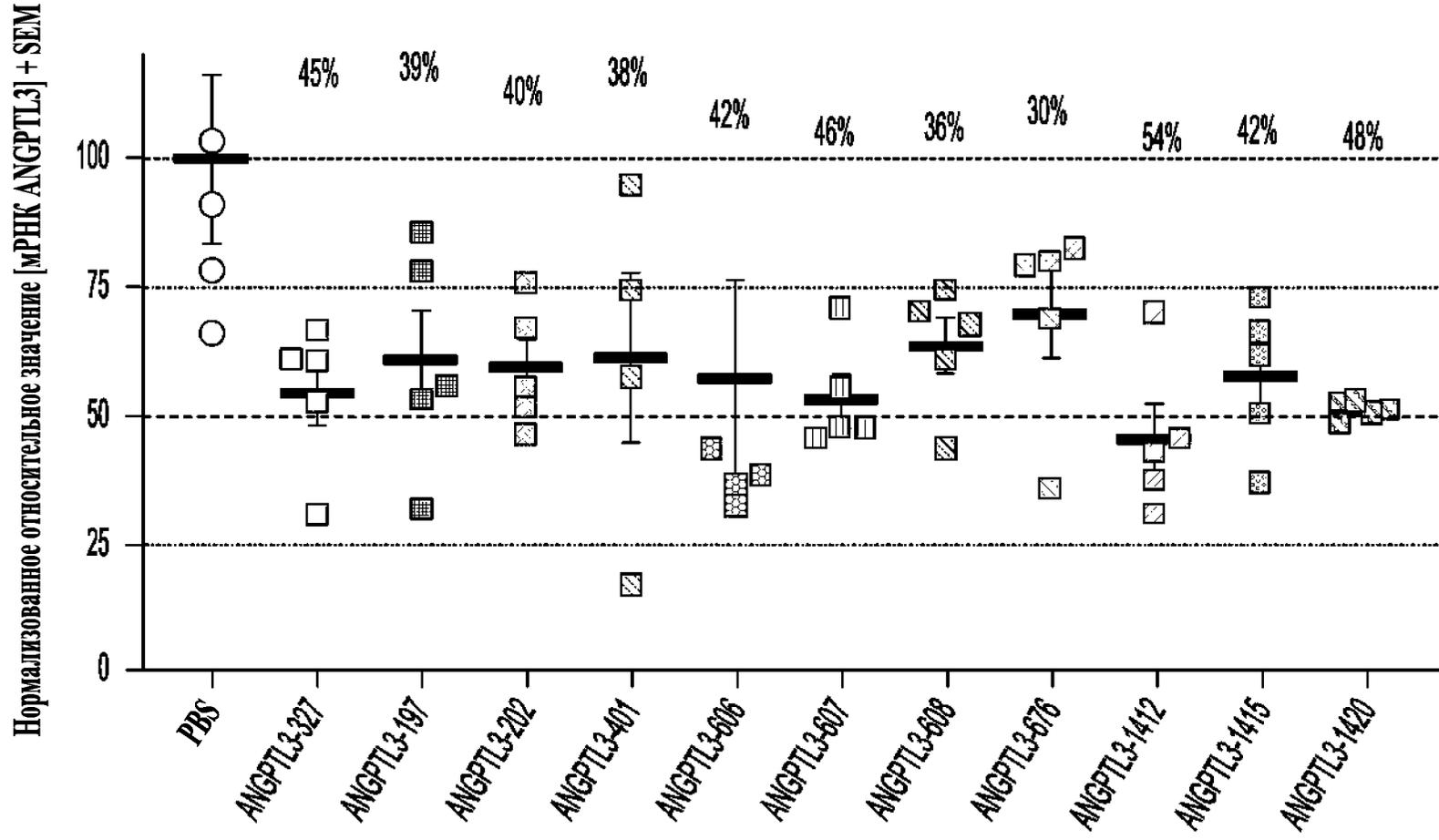
Фиг. 4 (продолж.)



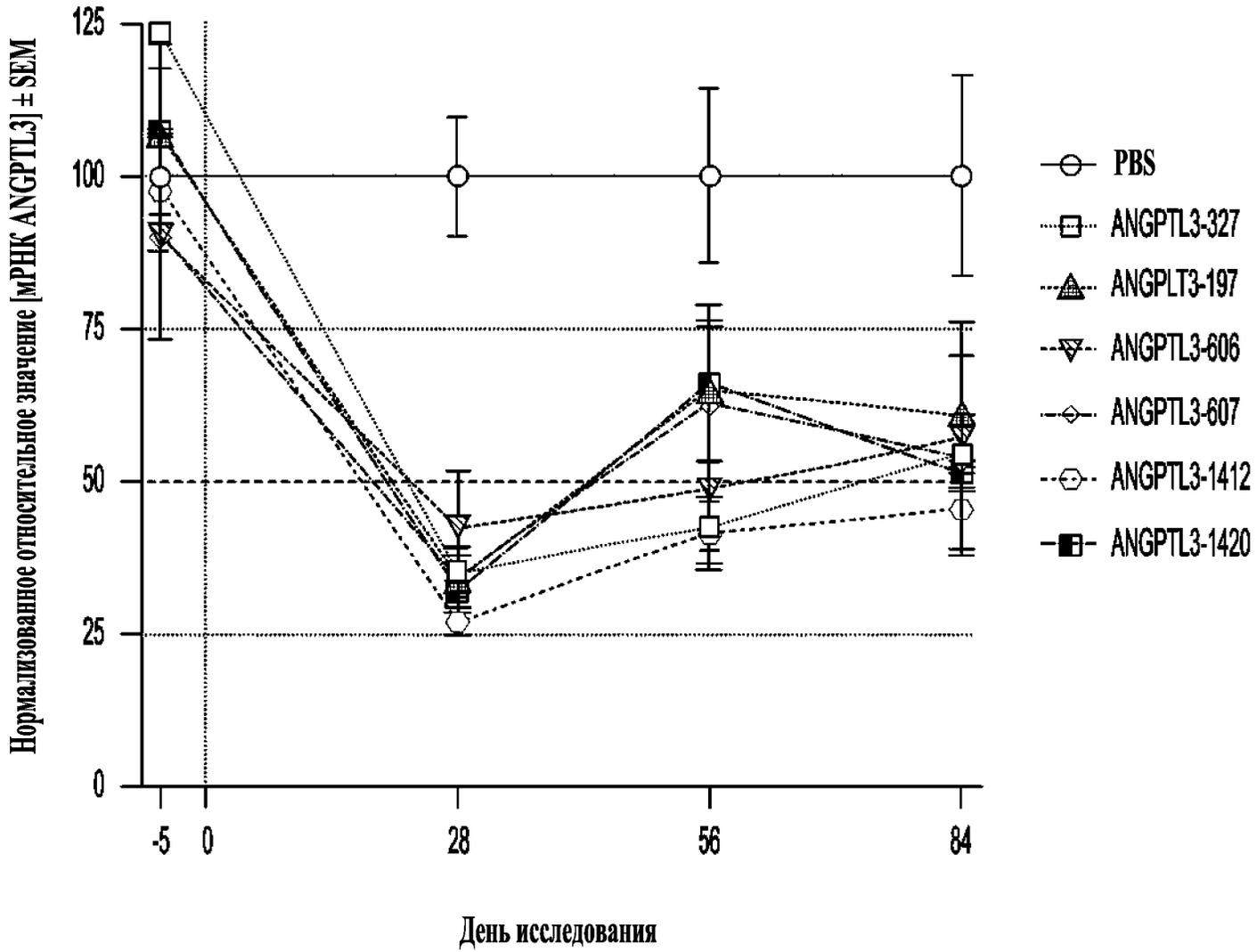
Фиг. 5А



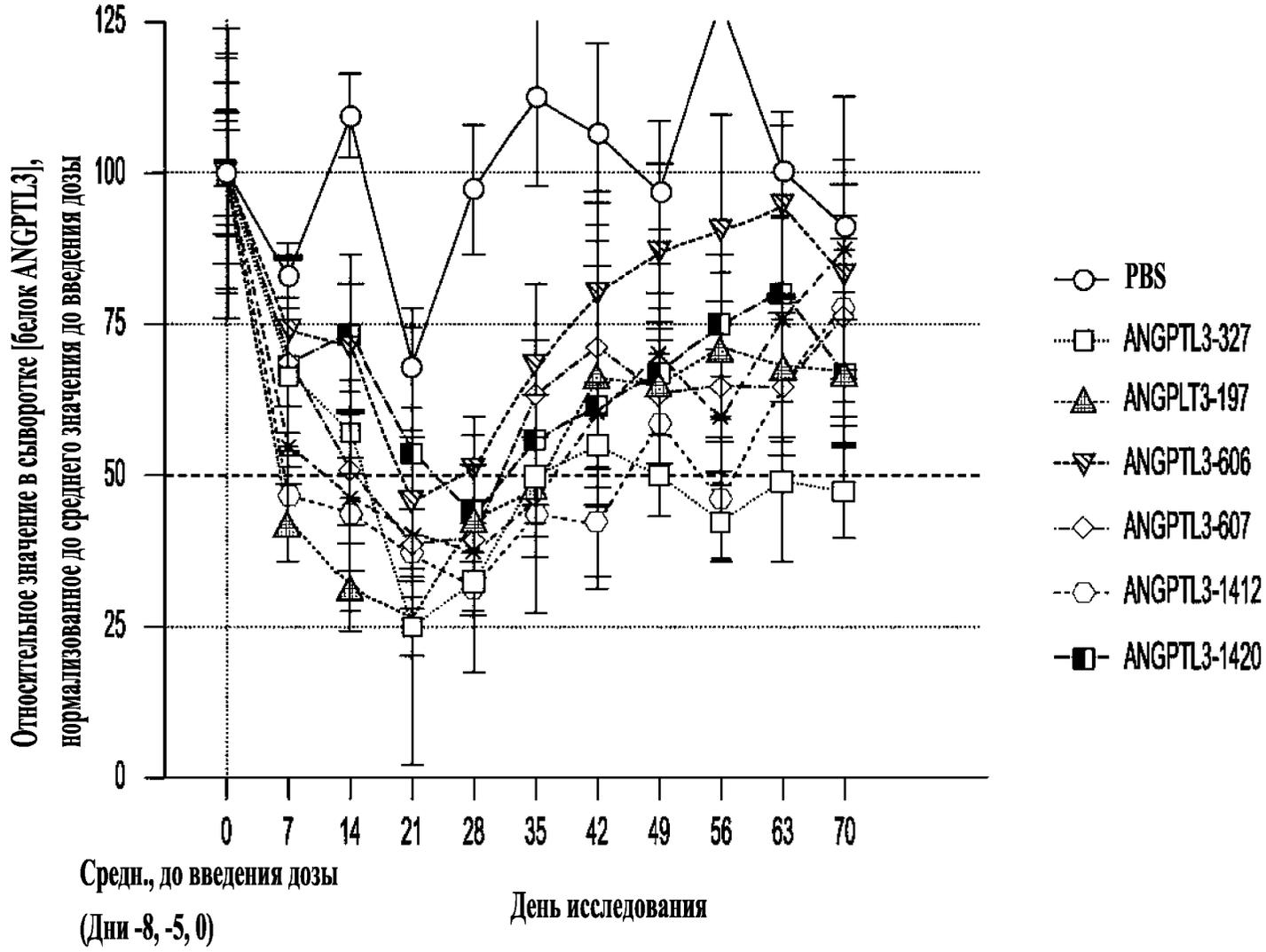
Фиг. 5B



Фиг. 5C



Фиг. 6



Фиг. 7