

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293105 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.13

(22) Дата подачи заявки
2021.04.26

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 31/713 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ АГЕНТА *irNA* АПОЛИПОПРОТЕИНА Е (АРОЕ) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/015,867

(32) 2020.04.27

(33) US

(86) PCT/US2021/029081

(87) WO 2021/222065 2021.11.04

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

(72) Изобретатель:

Боствик Брет Ли, Пэн Хайянь,
Макинич Джеймс Д., Касторено
Адам, Шлегель Марк К. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к агентам и композициям на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (dsRNA), нацеленным на ген АРОЕ, а также к способам ингибирования экспрессии гена АРОЕ и способам лечения субъектов, страдающих нейродегенеративным заболеванием или расстройством, связанным с АРОЕ, например болезнью Альцгеймера и болезнью Паркинсона, с использованием таких агентов и композиций dsRNAi.

A1

202293105

202293105

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576393EA/030

КОМПОЗИЦИИ АГЕНТА iRNA АПОЛИПОПРОТЕИНА E (APOE) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается преимущество приоритета по предварительной заявке США № 63/015867, поданной 27 апреля 2020 г., полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Упомянутая копия ASCII, созданная 20 апреля 2021 года, называется 121301_11220_SL.txt и имеет размер 200944 байта.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Ген *apolipoprotein E* кодирует белок аполипопротеина E (APOE), гликопротеин, который после расщепления сигнального пептида из 18 аминокислот состоит из 299 аминокислот. Существуют три распространенные изоформы APOE, APOE2, APOE3 и APOE4, кодируемые тремя соответствующими аллелями. Три изоформы APOE, ApoE ε2 (APOE2), ApoE ε3 (APOE3), ApoE ε4 (APOE4), отличаются друг от друга только положениями аминокислот 112 и 158; APOE2 имеет Cys112 и Cys158, APOE3 имеет Cys112 и Arg 158, а APOE4 имеет Arg112 и Arg158. APOE широко экспрессируется, но в основном экспрессируется периферически в гепатоцитах печени и глиальных клетках центральной нервной системы (ЦНС).

На периферии APOE участвует в липидном гомеостазе. Эти липопротеиновые частицы не могут преодолевать гематоэнцефалический барьер; исследования показали, что частицы, содержащие apoE, высвобождаемые астроцитами и микроглией, являются основными источниками apoE в головном мозге (Bjorkhem I, *et al.* (1998) *J Lipid Research* 39(8):1594-1600; Pitas RE, *et al.* (1987) *Biochimica Biophysica Acta*. 13;917(1):148-161; Krasemann S, *et al.* (2017) *Immunity*. 47(3):566-581.e9. doi:10.1016/j.immuni.2017.08.008). В головном мозге APOE модулирует несколько путей, включая транспорт липидов, синаптическую целостность и пластичность, метаболизм глюкозы, нейровоспаление и цереброваскулярную целостность. Например, после того, как APOE секретируется из клеток, несколько транспортеров (например, АТФ-связывающий кассетный транспортер) переносят холестерин и фосфолипиды к зарождающемуся APOE с образованием липопротеиновых частиц, которые APOE впоследствии распределяет по нейронам посредством связывания с рецепторами APOE, такими как члены семейства рецепторов LDL (LDLR). Кроме того, было замечено, что фенотип ApoE сыворотки, но не фенотип ApoE спинномозговой жидкости (CSF) реципиента полностью преобразовался в фенотип донора после трансплантации печени. Кроме того, астроциты продуцируют APOE в виде частиц, подобных липопротеинам высокой плотности (HDL), которые обладают

свойствами, отличными от АРОЕ, полученного из других источников (см., например, Morikawa, *et al.*, *Neurobiol Dis.* Jun-Jul 2005;19(1-2): 66-76). Следовательно, АРОЕ в спинномозговой жидкости не может быть получен из пула плазмы и поэтому должен быть синтезирован локально (Linton MF, *et al.* (1991) *J Clin Invest.* 88(1):270-281. doi:10.1172/JCI115288).

Полиморфизм гена АРОЕ связан с множественными протеинопатиями. Лучше всего установлена связь между полиморфизмом АРОЕ и заболеванием между генотипом АРОЕ и болезнью Альцгеймера (БА), которая, как было показано, является основной детерминантой риска позднего начала болезни Альцгеймера, симптомы которой развиваются после 65 лет. Кроме того, в недавней работе лаборатории Haltzman описано, что наличие аллеля $\epsilon 4$ значительно ускоряет прогрессирование заболевания ($p=0,02$), при этом один аллель $\epsilon 4$ увеличивает скорость прогрессирования на 14%, а два аллеля $\epsilon 4$ увеличивают скорость на 23% по сравнению с людьми, не являющимися носителями. (Holtzman, *et al.* (2017) *Nature* 549:523). БА является ведущей причиной деменции у пожилых людей, и ее патологические признаки включают отложение внеклеточных агрегатов амилоида- β ($A\beta$) в виде бляшек амилода и внутриклеточных агрегатов гиперфосфорилированного тау в виде нейрофибриллярных клубков наряду с потерей нейронов и активацией глии. Поскольку люди с поздним началом болезни Альцгеймера составляют 95% и более от общей популяции больных БА, предпринимаются различные попытки выяснить роль АРОЕ в развитии болезни Альцгеймера.

Более конкретно, было показано, что субъекты, имеющие одну копию АРОЕ4, имеют более чем трехкратный риск развития БА, а субъекты, имеющие две копии АРОЕ4, имеют более чем 12-кратный повышенный риск развития БА, в то время как две копии АРОЕ2 защищают субъектов от развития болезни Альцгеймера (Reiman EM, *et al.* (2020) *Nature Communications* 11 (1); 667). Кроме того, было зарегистрировано три случая нокаута гена АРОЕ у людей, и ни один из этих субъектов не страдал деменцией во время посещения больницы (возраст 40-60 лет) (Ghiselli, *et al.* (1981) *Science* 214(4526):1239; Mak, *et al.* (2014) *JAMA Neurol* 71:1228; и Lohse, *et al.* (1992) *J Lipid Res.* (11):1583). В одном из трех случаев (мужчина 40 лет) МРТ и тесты биомаркеров спинномозговой жидкости (CSF) В одном из трех случаев (мужчина 40 лет) МРТ и тесты биомаркеров спинномозговой жидкости. Кроме того, недавнее тематическое исследование показало, что мутация Крайстчерча в АроЕ3 может снова защищать от деменции, вызванной пресенилином 1, о чем свидетельствует сохраненная когнитивная функция и ограниченная таупатия при РЕТ. Наличие мутации Крайстчерча привело к потере функции связывания АроЕ3 с HSPG и рецепторами LDL, и у пациента гиперлиппротеинемия III типа, но нет сердечно-сосудистых заболеваний (Arboleda-Velasquez, *et al.* (2019) *Nature Medicine* 25:1680).

На моделях мышей с индуцируемым АроЕ амилоидом также было продемонстрировано, что повышенная экспрессия АроЕ4 ускоряет накопление амилоида и нейритную дистрофию (Liu, *et al.* (2017) *Neuron* 96:1024) и Huynh, *et al.* (*Neuron* (2017) 96:1013), и что антисмысловое ингибирование АРОЕ4 является защитным у мышей с

трансгенным белком-предшественником амилоида (APP)/пресениллином 1 (PS1-21). Кроме того, было показано, что делеция ApoE4 в мышинной модели таупатии защищала от нейродегенерации (Holtzman, *et al.* (2017) *Nature* 549:523) и что повторное введение экспрессии ApoE4 в нейроны человека, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, которые экспрессированный APOE4, но обнуление APOE приводит к усилению токсического эффекта от APOE4 (Wang, *et al.* (2018) *Nat Medicine* 24:647). Кроме того, было показано, что ограничение экспрессии APOE4 в печени мышей все еще может оказывать влияние на когнитивные способности и может нарушать гематоэнцефалический барьер и усиливать нейровоспаление (alzforum.org/news/research-news/apoe-has-hand-Alzheimer'ss-beyond-av-beyond-brain).

В настоящее время не существует способов излечения или профилактического лечения субъектов с нейродегенеративным заболеванием, связанным с APOE, таким как БА, и поддерживающее и симптоматическое лечение является основой лечения. Таким образом, в данной области техники существует потребность в композициях и способах лечения субъектов, страдающих или подверженных риску развития нейродегенеративного заболевания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложены композиции агента RNAi, которые воздействуют на опосредованное RNA индуцированным комплексом молчания (RISC) расщепление RNA-транскриптов гена аполипопротеина E (APOE). Ген APOE может находиться в клетке, например, в клетке субъекта, такого как человек. В настоящем изобретении предложены также способы применения композиций агента RNAi по изобретению для ингибирования экспрессии гена APOE или для лечения субъекта, для которого было бы полезно ингибировать или снижать экспрессию гена APOE, например, патогенного аллеля APOE, то есть APOE4, например, субъекта, страдающего или предрасположенного к развитию нейродегенеративного заболевания, связанного с APOE, такого как заболевание, опосредованное β -амилоидом, или заболевание, опосредованное тау-белком. В частности, композиции агента RNAi по настоящему изобретению способны воздействовать на уникальную экспрессию APOE астроцитами в ЦНС для лечения нейродегенеративного заболевания, связанного с APOE.

Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к агенту двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (RNAi) для ингибирования экспрессии гена аполипопротеина E (APOE), где агент RNAi включает смысловую цепь и антисмысловую цепь, и где антисмысловая цепь включает область комплементарности, которая включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от любой из антисмысловых последовательностей, перечисленных в какой-либо из таблиц 2-5 и 7-10. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь включает область комплементарности, которая включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов любой из антисмысловых последовательностей, перечисленных в какой-либо

из таблиц 2-5 и 7-10. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь включает область комплементарности, которая включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов любой из антисмысловых последовательностей, перечисленных в какой-либо из таблиц 7 и 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь включает область комплементарности, которая включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов любой из антисмысловых последовательностей, перечисленных в какой-либо из таблиц 9 и 10. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь включает область комплементарности, которая включает по меньшей мере 19 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от любой из антисмысловых последовательностей, перечисленных в какой-либо из таблиц 2-5 и 7-10. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь включает область комплементарности, которая включает по меньшей мере 19 примыкающих друг к другу нуклеотидов (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от любой из антисмысловых последовательностей, перечисленных в какой-либо из таблиц 7 и 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь включает область комплементарности, которая включает по меньшей мере 19 примыкающих друг к другу нуклеотидов (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от любой из антисмысловых последовательностей, перечисленных в какой-либо из таблиц 9 и 10. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь включает область комплементарности, которая включает по меньшей мере 19 примыкающих друг к другу нуклеотидов любой из антисмысловых последовательностей, перечисленных в какой-либо из таблиц 2-5 и 7-10. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь включает область комплементарности, которая включает по меньшей мере 19 примыкающих друг к другу нуклеотидов любой из антисмысловых последовательностей, перечисленных в какой-либо из таблиц 7 и 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь включает область комплементарности, которая включает по меньшей мере 19 примыкающих друг к другу нуклеотидов любой из антисмысловых последовательностей, перечисленных в какой-либо из таблиц 9 и 10. В некоторых вариантах осуществления изобретения различия между тиминном и урацилом или между урацилом и тиминном между выровненными (сравненными) последовательностями не учитываются как нуклеотиды, которые различаются между выровненными (сравненными) последовательностями.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты включают один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими внутренними нуклеотидными положениями, необязательно через линкер или носитель.

В других вариантах осуществления изобретения агент дополнительно содержит нацеливающий лиганд, который нацеливается на ткань печени, например, одно или несколько производных GalNAc, необязательно конъюгированных с агентом двухцепочечной RNAi через линкер или носитель.

В еще других вариантах осуществления изобретения агенты дополнительно содержат один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими внутренними нуклеотидными положениями, необязательно через линкер или носитель и нацеливающий лиганд, который нацеливается на ткань печени, например, одно или несколько производных GalNAc, необязательно конъюгированных с агентом двухцепочечной RNAi через линкер или носитель.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию аллеля APOE2, аллеля APOE3 и аллеля APOE4. В других вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию APOE4, но практически не ингибируют экспрессию APOE2 и APOE3, например, экспрессия APOE2 и APOE3 ингибируется не более чем на около 10%.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен агент двухцепочечной RNAi для ингибирования экспрессии гена аполипопротеина E (APOE), где агент dsRNA включает смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от любой из последовательностей смысловых цепей, представленных в таблицах 2-5 и 7-10; и где антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от любой из последовательностей нуклеотидов антисмысловой цепи, представленных в таблицах 2-5 и 7-10. В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов любой последовательности смысловой цепи, из представленных в таблицах 2-5 и 7-10; и где антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов любой последовательности антисмысловой цепи нуклеотида, из представленных в таблицах 2-5 и 7-10. В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов любой последовательности смысловой цепи, из представленных в таблицах 7 и 8; и где антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов любой последовательности антисмысловой цепи нуклеотида, из представленных в таблицах 7 и 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов любой последовательности смысловой цепи, из представленных в таблицах 9 и 10; и где антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов любой последовательности антисмысловой цепи нуклеотида, из представленных в таблицах 9 и 10. В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь включает по меньшей мере 19 примыкающих друг к другу нуклеотидов (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от любой последовательности смысловой цепи, из представленных в таблицах 2-5 и 7-10; и где антисмысловая цепь включает по меньшей мере 19 примыкающих друг к другу нуклеотидов любой последовательности антисмысловой цепи нуклеотида, из представленных в таблицах 2-5 и 7-10 (то есть

отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от любой из последовательностей нуклеотидов антисмысловой цепи, представленных в таблицах 2-5 и 7-10. В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь включает по меньшей мере 19 примыкающих друг к другу нуклеотидов (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) любой последовательности смысловой цепи, из представленных в таблицах 7 и 8; и где антисмысловая цепь включает по меньшей мере 19 примыкающих друг к другу нуклеотидов (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) любой последовательности антисмысловой цепи нуклеотида, из представленных в таблицах 7 и 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь включает по меньшей мере 19 примыкающих друг к другу нуклеотидов (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) любой последовательности смысловой цепи, из представленных в таблицах 9 и 10; и где антисмысловая цепь включает по меньшей мере 19 примыкающих друг к другу нуклеотидов (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) любой последовательности антисмысловой цепи нуклеотида, из представленных в таблицах 9 и 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты включают один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими внутренними нуклеотидными положениями, необязательно через линкер или носитель.

В других вариантах осуществления изобретения агент дополнительно содержит нацеливающий лиганд, который нацеливается на ткань печени, например, одно или несколько производных GalNAc, необязательно конъюгированных с агентом двухцепочечной RNAi через линкер или носитель.

В еще других вариантах осуществления изобретения агенты дополнительно содержат один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими внутренними нуклеотидными положениями, необязательно через линкер или носитель, и нацеливающий лиганд, который нацеливается на ткань печени, например, одно или несколько производных GalNAc, необязательно конъюгированных с агентом двухцепочечной RNAi через линкер или носитель.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию аллеля APOE2, аллеля APOE3 и аллеля APOE4. В других вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию APOE4, но практически не ингибируют экспрессию APOE2 и APOE3, например, экспрессия APOE2 и APOE3 ингибируется не более чем на около 10%.

Дополнительный аспект изобретения относится к агенту двухцепочечной RNAi для ингибирования экспрессии гена аполипопротеина E (APOE) ген, где агент dsRNA включает смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов от любой из последовательностей нуклеотидов SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 или 9, или нуклеотидной последовательности по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности, например, на 90, 91, 92, 93, 94,

95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной полной нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 или 9, где замена урацила на любой тимин в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 и 9 (при сравнении выровненных последовательностей) не считается отличием, которое способствует отличию не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличию на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 и 9 или нуклеотидной последовательности по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности, например, на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной полной нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 или 9; и где антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 или 10, или нуклеотидной последовательности по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности, например, на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной полной нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 или 10, где замена урацила на любой тимин в SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 и 10 (при сравнении выровненных последовательностей) не считается отличием, которое способствует отличию не более чем на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 и 10, или нуклеотидной последовательности по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности, например, на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной полной нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 или 10, где по меньшей мере одна смысловая цепь или антисмысловая цепь включает один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими внутренними нуклеотидными положениями, необязательно через линкер или носитель.

В одном варианте осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi, нацеленный на APOE, содержит смысловую цепь, которая включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от нуклеотидной последовательности смысловой цепи нуклеотидной последовательности дуплекса в таблицах 2-5 и 7-10. В одном варианте осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi, нацеленный на APOE, содержит смысловую цепь, которая включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от нуклеотидной последовательности смысловой цепи нуклеотидной последовательности дуплекса в таблицах 7 и 8. В одном варианте осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi, нацеленный на APOE, содержит смысловую цепь, которая включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от нуклеотидной последовательности смысловой цепи нуклеотидной последовательности дуплекса в таблицах 9 и 10.

В одном варианте осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi, нацеленный на APOE, содержит антисмысловую цепь, которая включает по меньшей мере

15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от антисмысловой нуклеотидной последовательности любого из дуплексов в одной из таблиц 2-5 и 7-10. В одном варианте осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi, нацеленный на APOE, содержит антисмысловую цепь, которая включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от антисмысловой нуклеотидной последовательности дуплекса в одной из таблиц 7 и 8. В одном варианте осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi, нацеленный на APOE, содержит антисмысловую цепь, которая включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от антисмысловой нуклеотидной последовательности дуплекса в одной из таблиц 9 и 10.

В одном варианте осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi, нацеленный на APOE, содержит смысловую цепь, которая включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов 50-113, 59-97, 59-90, 107-177, 107-153, 124-153, 198-240, 203-240, 209-240, 283-378, 283-312, 307-378, 322-369, 330-357, 394-419, 568-600, 568-594, 841-879, 900-926, 997-1055, 1002-1044, 1014-1044, 1019-1044, 1120-1166, 1130-1166, 1130-1155 последовательности SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2.

В одном варианте осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi, нацеленный на APOE, содержит смысловую цепь, которая включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов 59-90, 330-357, 568-594, 1019-1044, 1130-1155 последовательности SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2.

В одном варианте осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi, нацеленный на APOE, содержит смысловую цепь, которая включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов 57-79, 62-84, 75-97, 86-108, 207-229, 213-235, 218-240, 898-920, 1128-1150, 637-659 последовательности SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2.

В другом варианте осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi, нацеленный на APOE, содержит смысловую цепь, которая включает по меньшей мере 15

примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов 57-79, 62-84, 207-229, 1128-1150 последовательности SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2.

В одном варианте осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi, нацеленный на APOE, содержит антисмысловую цепь, которая включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от любой из последовательностей нуклеотидов антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, включающей AD-1204704, AD-1204705, AD-1204705, AD-1204706 AD-1204707, AD-1204708, AD-1204709, AD-1204710, AD-1204711, AD-1204712 и AD-1204713.

В одном варианте осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi, нацеленный на APOE, содержит антисмысловую цепь, которая включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от любой из последовательностей нуклеотидов антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, включающей AD-1204704, AD-1204705, AD-1204708 и AD-1204712.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент дополнительно содержит нацеливающий лиганд, который нацеливается на ткань печени, например, одно или несколько производных GalNAc, необязательно конъюгированных с агентом двухцепочечной RNAi через линкер или носитель.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию аллеля APOE2, аллеля APOE3 и аллеля APOE4. В других вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию APOE4, но практически не ингибируют экспрессию APOE2 и APOE3, например, экспрессия APOE2 и APOE3 ингибируется не более чем на около 10%.

Необязательно, агент двухцепочечной RNAi включает по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления изобретения липофильность липофильного фрагмента, измеренная с помощью logKow, превышает 0.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гидрофобность агента двухцепочечной RNAi, измеренная несвязанной фракцией в анализе связывания с белками плазмы агента двухцепочечной RNAi, превышает 0,2. В родственном варианте осуществления анализ связывания с белками плазмы представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности с использованием белка сывороточного альбумина человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения практически все нуклеотиды смысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды. Необязательно, все нуклеотиды смысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В некоторых вариантах осуществления изобретения практически все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды. Необязательно, все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды.

Необязательно, все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В одном варианте осуществления изобретения по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов представляет собой дезоксинуклеотид, 3'-концевой дезокситимидиновый (dT) нуклеотид, 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, 2'-дезоксид-модифицированный нуклеотид, заблокированный нуклеотид, разблокированный нуклеотид, конформационно ограниченный нуклеотид, конформационно затрудненный этилом нуклеотид, абазический нуклеотид, 2'-амино-модифицированный нуклеотид, 2'-О-аллил-модифицированный нуклеотид, 2'-С-алкил-модифицированный нуклеотид, 2'-гидроксил-модифицированный нуклеотид, 2'-метоксиэтил-модифицированный нуклеотид, 2'-О-алкил-модифицированный нуклеотид, морфолинонуклеотид, фосфорамидат, нуклеотид, содержащий неприродное основание, нуклеотид, модифицированный тетрагидропираном, нуклеотид, модифицированный 1,5-ангидрогекситолом, нуклеотид, модифицированный циклогексенилом, нуклеотид, содержащий 5'-фосфоротиоатную группу, нуклеотид, содержащий 5'-метилфосфонатную группу, нуклеотид, содержащий 5'-фосфат или 5'-миметик фосфата, нуклеотид, содержащий винилфосфонат, нуклеотид, содержащий аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), нуклеотид, содержащий S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), нуклеотид, содержащий 2-гидроксиметил-тетрагидрофуран-5-фосфат, нуклеотид, содержащий 2'-деокситимидин-3'-фосфат, нуклеотид, содержащий 2'-деоксигуанозин-3'-фосфат, или концевой нуклеотид, связанный с производным холестерина или бисдециламидной группой додекановой кислоты.

В родственном варианте осуществления модифицированный нуклеотид представляет собой 2'-деокси-2'-фтор-модифицированный нуклеотид, 2'-дезоксид-модифицированный нуклеотид, 3'-концевые дезокситимидиновые нуклеотиды (dT), заблокированный нуклеотид, абазический нуклеотид, 2'-амино-модифицированный нуклеотид, 2'-алкил-модифицированный нуклеотид, морфолинонуклеотид, фосфорамидат или нуклеотид, содержащий неприродное основание.

В одном варианте осуществления изобретения модифицированный нуклеотид включает короткую последовательность 3'-концевых дезокситимидиновых нуклеотидов (dT).

В другом варианте осуществления изобретения модификации нуклеотидов представляют собой 2'-О-метил, 2'-фтор и GNA модификации.

В дополнительном варианте осуществления агент двухцепочечной RNAi включает по меньшей мере одну фосфоротиоатную межнуклеотидную связь. Необязательно, агент

двухцепочечной RNAi включает 6-8 (например, 6, 7 или 8) фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

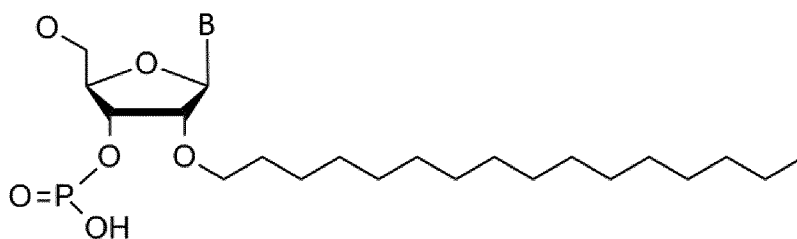
В некоторых вариантах осуществления изобретения участок комплементарности имеет длину по меньшей мере 17 нуклеотидов. Необязательно, участок комплементарности имеет длину 19-23 нуклеотида. Необязательно, участок комплементарности имеет длину 19 нуклеотидов.

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

В другом варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна цепь включает выступающий 3'-конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. Необязательно, по меньшей мере одна цепь включает 3'-выступ, по крайней мере, из 2 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi дополнительно включает липофильный лиганд, например, лиганд C16, конъюгированный с 3'-концом смысловой цепи через одновалентный или разветвленный двухвалентный или трехвалентный линкер. В некоторых вариантах осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi дополнительно включает липофильный лиганд, например, лиганд C16, конъюгированный с внутренним положением нуклеотида, например, через одновалентный или разветвленный двухвалентный или трехвалентный линкер.

В одном варианте осуществления изобретения лиганд представляет собой



где В представляет собой нуклеотидное основание или аналог нуклеотидного основания, где, необязательно, В представляет собой аденин, гуанин, цитозин, тимин или урацил.

В других вариантах осуществления изобретения агент дополнительно содержит нацеливающий лиганд, который нацеливается на ткань печени, например, одно или несколько производных GalNAc, необязательно конъюгированных с агентом двухцепочечной RNAi через линкер или носитель.

В еще других вариантах осуществления изобретения агенты дополнительно содержат липофильный лиганд, например, C16 лиганд, конъюгированный с внутренним положением нуклеотида, например, через одновалентный или разветвленный двухвалентный или трехвалентный линкер, и нацеливающий лиганд, который нацеливается на ткань печени, например, одно или несколько производных GalNAc, конъюгированных с 3'-концом смысловой цепи через одновалентный или разветвленный двухвалентный или трехвалентный линкер.

В другом варианте осуществления изобретения участок комплементарности АРОЕ включает любую из антисмысловых последовательностей, указанных в любой из таблиц 2-5 и 7-10. В некоторых вариантах осуществления изобретения участок комплементарности АРОЕ включает любую из антисмысловых последовательностей, указанных в любой из таблиц 7 и 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения участок комплементарности АРОЕ включает любую из антисмысловых последовательностей, указанных в любой из таблиц 9 и 10.

В дополнительном варианте осуществления участок комплементарности АРОЕ представляет собой участок любой из антисмысловых последовательностей, указанных в любой из таблиц 2-5 и 7-10. В некоторых вариантах осуществления изобретения участок комплементарности АРОЕ представляет собой участок любой из антисмысловых последовательностей, указанных в любой из таблиц 7 и 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения внутренние положения нуклеотидов включают все положения, кроме двух концевых положений с каждого конца цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения участок комплементарности АРОЕ представляет собой участок любой из антисмысловых последовательностей, указанных в любой из таблиц 9 и 10. В некоторых вариантах осуществления изобретения внутренние положения нуклеотидов включают все положения, кроме двух концевых положений с каждого конца цепи.

В родственном варианте осуществления изобретения внутренние положения включают все положения, кроме трех концевых положений с каждого конца цепи. Необязательно, внутренние положения исключают область сайта расщепления смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения внутренние положения исключают положения 9-12, считая от 5'-конца смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения длина смысловой цепи составляет 21 нуклеотид.

В других вариантах осуществления изобретения внутренние положения исключают положения 11-13, считая от 3'-конца смысловой цепи. Необязательно, внутренние положения исключают область сайта расщепления антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения длина смысловой цепи составляет 21 нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления изобретения внутренние положения исключают положения 12-14, считая от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения длина антисмысловой цепи составляет 23 нуклеотида.

В другом варианте осуществления изобретения внутренние положения, за исключением положений 11-13 на смысловой цепи, считая от 3'-конца, и положений 12-14 на антисмысловой цепи, считая от 5'-конца. В некоторых вариантах осуществления изобретения длина смысловой цепи составляет 21 нуклеотид и длина антисмысловой цепи составляет 23 нуклеотида.

В дополнительном варианте осуществления один или несколько липофильных фрагментов конъюгированы с одним или несколькими из следующих внутренних положений: положения 4-8 и 13-18 на смысловой цепи, и положения 6-10 и 15-18 на антисмысловой цепи, считая с 5'-конца каждой цепи. Необязательно, один или несколько липофильных фрагментов конъюгированы с одним или несколькими из следующих внутренних положений: положения 5, 6, 7, 15 и 17 на смысловой цепи, и положений 15 и 17 на антисмысловой цепи, считая от 5'-конца каждой цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения длина смысловой цепи составляет 21 нуклеотид и длина антисмысловой цепи составляет 23 нуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления изобретения липофильный фрагмент представляет собой алифатическое, алициклическое или полиалициклическое соединение. Необязательно, липофильный фрагмент представляет собой липид, холестерин, ретиноевую кислоту, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилксигексанол, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1, 3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, О3-(олеоил)лихолевую кислоту, О3-(олеоил)холевую кислоту, диметокситритил или феноксазин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь C_4 - C_{30} и, необязательно, функциональную группу, выбранную из гидроксила, амина, карбоновой кислоты, сульфоната, фосфата, тиола, азида или алкина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь C_6 - C_{18} . Необязательно, липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C_{16} углеводородную цепь. В родственном варианте осуществления изобретения липофильный фрагмент конъюгирован через носитель, который заменяет один или несколько нуклеотидов во внутреннем положении(ях). В некоторых вариантах осуществления изобретения носитель представляет собой циклическую группу, которая представляет собой пирролидинил, пиразолинил, пиразолидинил, имидазолинил, имидазолидинил, пиперидинил, пиперазинил, [1,3]диоксоланил, оксазолидинил, изоксазолидинил, морфолинил, тиазолидинил, изотиазолидинил, хиноксалинил, пиридазинонил, тетрагидрофуранил или декалинил; или представляет собой ациклический фрагмент, основанный на остове серинола или остове диэтаноламина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения липофильный фрагмент конъюгирован с агентом двухцепочечной $RNAi$ через линкер, содержащий эфирную, тиоэфирную, мочевиновую, карбонатную, аминую, амидную, малеимид-тиоэфирную, дисульфидную, фосфодиэфирную, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.

В одном варианте осуществления изобретения липофильный фрагмент конъюгирован с азотистым основанием, сахарным фрагментом или межнуклеозидной связью.

В другом варианте осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi дополнительно включает фосфат или имитатор фосфата на 5'-конце антисмысловой цепи. Необязательно, имитатор фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi дополнительно включает нацеливающий лиганд, который нацелен на рецептор, опосредующий доставку в ткань ЦНС, например, гидрофильный лиганд. В некоторых вариантах осуществления изобретения нацеливающий лиганд представляет собой C16 лиганд.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi дополнительно включает нацеливающий лиганд, который нацелен на ткань головного мозга, например полосатое тело.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi дополнительно включает нацеливающий лиганд, который нацеливается на ткань печени, например, гепатоциты.

В одном варианте осуществления изобретения липофильный фрагмент или нацеливающий лиганд конъюгирован посредством биорасщепляемого линкера, который представляет собой DNA, RNA, дисульфид, амид, функционализированные моносахариды или олигосахариды галактозамина, глюкозамина, глюкозы, галактозы, маннозы или их комбинации.

В родственном варианте осуществления изобретения 3'-конец смысловой цепи защищен с помощью концевой кэпа, который представляет собой циклическую группу, содержащую амин, причем циклическая группа представляет собой пирролидинил, пиразолинил, пиразолидинил, имидазолинил, имидазолидинил, пиперидинил, пиперазинил, [1,3]диоксоланил, оксазолидинил, изоксазолидинил, морфолинил, тиазолидинил, изотиазолидинил, хиноксалинил, пиридазинонил, тетрагидрофуранил или декалинил.

В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi включает по меньшей мере один модифицированный нуклеотид, который представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, нуклеотид, который включает гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA) или нуклеотид, который включает винилфосфонат. Необязательно, агент RNAi включает по меньшей мере одну из каждой из следующих модификаций: 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, нуклеотид, содержащий гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA) и нуклеотид, содержащий винилфосфонат.

В другом варианте осуществления изобретения агент RNAi включает набор модифицированных нуклеотидов, представленных ниже в таблицах 2-5 и 7-10, где расположение модификаций 2'-C16, 2'-О-метил, GNA, фосфоротиоат и 2'-фтор, независимо

от индивидуальных последовательностей нуклеотидных оснований отображаемых агентов RNAi. В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi включает набор модифицированных нуклеотидов, представленных ниже в таблицах 7 и 8, где расположение модификаций 2'-C16, 2'-O-метил, GNA, фосфоротиоат и 2'-фтор, независимо от индивидуальных последовательностей нуклеотидных оснований отображаемых агентов RNAi. В другом варианте осуществления изобретения агент RNAi включает набор модифицированных нуклеотидов, представленных ниже в таблицах 9 и 10, где расположение модификаций 2'-C16, 2'-O-метил, GNA, фосфоротиоат и 2'-фтор модификации, независимо от индивидуальных последовательностей нуклеотидных оснований отображаемых агентов RNAi.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен агент двухцепочечной RNAi для ингибирования экспрессии гена APOE, где агент двухцепочечной RNAi включает смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь включает участок, комплементарный части mRNA, кодирующей APOE, где каждая цепь имеет длину от около 14 до около 30 нуклеотидов, где агент двухцепочечной RNAi представлен формулой (III):

смысловая:	$5' n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q 3'$
антисмысловая:	$3' n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q' 5' \text{ (III)}$

где:

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

p, p', q и q', каждый, независимо, обозначают 0-6;

каждый N_a и N_a' независимо представляют собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо немодифицированы, или их комбинации, где каждая последовательность включает по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

каждый N_b и N_b' независимо представляют собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо немодифицированы, или их комбинации;

каждый n_p , n_p' , n_q и n_q' , каждый из которых может присутствовать или не присутствовать, независимо представляют собой выступающий нуклеотид;

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

модификации N_b отличаются от модификации Y, и модификации N_b' отличаются от модификации Y'; и

где смысловая цепь конъюгирована по крайней мере с одним лигандом.

В одном варианте осуществления изобретения i обозначает 0; j обозначает 0; i обозначает 1; j обозначает 1; оба i и j обозначают 0; или оба i и j обозначают 1.

В другом варианте осуществления изобретения k обозначает 0; l обозначает 0; k обозначает 1; l обозначает 1; оба k и l обозначают 0; или оба k и l обозначают 1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения XXX комплементарен X'X'X', YYY комплементарен Y'Y'Y' и ZZZ комплементарен Z'Z'Z'.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию аллеля APOE2, аллеля APOE3 и аллеля APOE4. В других вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию APOE4, но практически не ингибируют экспрессию APOE2 и APOE3, например, экспрессия APOE2 и APOE3 ингибируется не более чем на около 10%.

В другом варианте осуществления изобретения мотив YYY находится в месте расщепления смысловой цепи или рядом с ним.

В дополнительном варианте осуществления мотив Y'Y'Y' находится в положениях 11, 12 и 13 антисмысловой цепи от 5'-конца. Необязательно, Y' представляет собой 2'-О-метил.

В некоторых вариантах осуществления изобретения формула (III) представлена формулой (IIIa):

смысловая:	5' n _p -N _a -YYY-N _a -n _q 3'
антисмысловая:	3' n _p '-N _a '-Y'Y'Y'-N _a '-n _q ' 5' (IIIa)

В другом варианте осуществления изобретения формула (III) представлена формулой (IIIb):

смысловая:	5' n _p -N _a -YYY-N _b -ZZZ-N _a -n _q 3'
антисмысловая:	3' n _p '-N _a '-Y'Y'Y'-N _b '-Z'Z'Z'-N _a '-n _q ' 5' (IIIb)

где каждый N_b и N_b' независимо представляют собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 1-5 модифицированные нуклеотиды.

В дополнительном варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIc):

смысловая:	5' n _p -N _a -XXX-N _b -YYY-N _a -n _q 3'
антисмысловая:	3' n _p '-N _a '-X'X'X'-N _b '-Y'Y'Y'-N _a '-n _q ' 5' (IIIc)

где каждый N_b и N_b' независимо представляют собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 1-5 модифицированные нуклеотиды.

В некоторых вариантах осуществления изобретения формула (III) представлена формулой (IIId):

смысловая:	5' n _p -N _a -XXX-N _b -YYY-N _b -ZZZ-N _a -n _q 3'
антисмысловая:	3' n _p '-N _a '-X'X'X'-N _b '-Y'Y'Y'-N _b '-Z'Z'Z'-N _a '-n _q ' 5' (IIId)

где каждый N_b и N_b' независимо представляют собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 1-5 модифицированные нуклеотиды, и каждый N_a и N_a' независимо представляют собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 2-10 модифицированные нуклеотиды.

В другом варианте осуществления изобретения длина двухцепочечной области составляет 15-30 пар нуклеотидов. Необязательно, длина двухцепочечной области составляет 17-23 пары нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения длина двухцепочечной области составляет 17-25 пар нуклеотидов. Необязательно, длина двухцепочечной области составляет 23-27 пар нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения длина двухцепочечной области составляет 19-21 пару нуклеотидов. Необязательно, длина двухцепочечной области составляет 21-23 пары нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая цепь содержит 15-30 нуклеотидов. Необязательно, каждая цепь содержит 19-30 нуклеотидов. Необязательно, каждая цепь содержит 19-23 нуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления изобретения длина двухцепочечной области составляет 19-21 пару нуклеотидов и каждая цепь содержит 19-23 нуклеотида.

В другом варианте осуществления изобретения модификации нуклеотидов агента RNAi представляют собой LNA, гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), HNA, CeNA, 2'-метоксиэтил, 2'-О-алкил, 2'-О-аллил, 2'-С-аллил, 2'-фтор, 2'-деокси или 2'-гидроксил и их комбинации. Необязательно, модификации нуклеотидов включают 2'-О-метил, 2'-фтор или GNA, и их комбинации. В родственном варианте осуществления изобретения модификации нуклеотидов представляют собой 2'-О-метил или 2'-фтор модификации.

В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi включает лиганд, который представляет собой или включает одну или несколько липофильных, например, C16, фрагментов, присоединенных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В других вариантах осуществления изобретения агент дополнительно содержит нацеливающий лиганд, который нацеливается на ткань печени, например, одно или несколько производных GalNAc.

В еще других вариантах осуществления изобретения агенты дополнительно содержат липофильный лиганд, например, лиганд C16, конъюгированный с 3'-концом смысловой цепи через одновалентный или разветвленный двухвалентный или трехвалентный линкер, и нацеливающий лиганд, который нацеливается на ткань печени, например, одно или несколько производных GalNAc, конъюгированных с 3'-концом смысловой цепи через одновалентный или разветвленный двухвалентный или трехвалентный линкер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд присоединен к 3'-концу смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент RNAi дополнительно включает по меньшей мере одну фосфоротиаатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. В родственном варианте осуществления изобретения фосфоротиаатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце

одной цепи. Необязательно, цепь представляет собой антисмысловую цепь. В другом варианте осуществления изобретения цепь представляет собой смысловую цепь. В родственном варианте осуществления изобретения фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи. Необязательно, цепь представляет собой антисмысловую цепь. В другом варианте осуществления изобретения цепь представляет собой смысловую цепь.

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

В дополнительном варианте осуществления пара оснований в положении 1 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса агента RNAi представляет собой пару оснований A:U.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотиды Y содержат 2'-фтор-модификацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения Y' нуклеотиды Y' содержат 2'-О-метил модификацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения $p' > 0$. Необязательно, $p' = 2$.

В некоторых вариантах осуществления изобретения $q' = 0$, $p = 0$, $q = 0$ и выступающие нуклеотиды p' комплементарны целевой mRNA.

В некоторых вариантах осуществления изобретения $q' = 0$, $p = 0$, $q = 0$ и выступающие нуклеотиды p' некомплементарны целевой mRNA.

В одном варианте осуществления изобретения смысловая цепь агента RNAi пара оснований в положении 1 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса агента.

В другом варианте осуществления изобретения по меньшей мере один p_r' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи. Необязательно, все p_r' связаны с соседними нуклеотидами через фосфоротиоатные связи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент RNAi APOE по настоящему описанию является одним из агентов, перечисленных в таблицах 2-5 и 7-10. В некоторых вариантах осуществления изобретения агент RNAi APOE по настоящему описанию является одним из агентов, перечисленных в таблицах 7 и 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи включают модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения агент RNAi APOE по настоящему описанию является одним из агентов, перечисленных в таблицах 9 и 10. В некоторых вариантах осуществления изобретения все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи включают модификацию.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен агент двухцепочечной RNAi для ингибирования экспрессии гена APOE в клетке, где агент двухцепочечной RNAi включает смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь включает участок, комплементарный части mRNA, кодирующий ген APOE, где

каждая цепь имеет длину от около 14 до около 30 нуклеотидов, где агент двухцепочечной RNAi представлен формулой (III):

смысловая:	$5' n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q 3'$
антисмысловая:	$3' n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q' 5' \text{ (III)}$

где:

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

p, p', q и q', каждый, независимо, обозначают 0-6;

каждый N_a и N_a' независимо представляют собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо немодифицированы, или их комбинации, где каждая последовательность включает по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

каждый N_b и N_b' независимо представляют собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо немодифицированы, или их комбинации;

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

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z', каждый, независимо, представляют собой один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации представляет собой 2'-О-метил или 2'-фтор модификации;

модификации N_b отличаются от модификации Y, и модификации N_b' отличаются от модификации Y'; и

где смысловая цепь конъюгирована по крайней мере с одним лигандом, где, необязательно, лиганд является одним или несколькими липофильными, например, C16, лиганды и/или одно или несколько производных GalNAc.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию аллеля APOE2, аллеля APOE3 и аллеля APOE4. В других вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию APOE4, но практически не ингибируют экспрессию APOE2 и APOE3, например, экспрессия APOE2 и APOE3 ингибируется не более чем на около 10%.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к агенту двухцепочечной RNAi для ингибирования экспрессии гена APOE в клетке, где агент двухцепочечной RNAi включает смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь включает участок, комплементарный части mRNA, кодирующей APOE, где каждая цепь имеет длину от около 14 до около 30 нуклеотидов, где агент двухцепочечной RNAi представлен формулой (III):

смысловая:	$5' n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q 3'$
антисмысловая:	$3' n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q' 5' \text{ (III)}$

где:

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

каждый N_p , n_q , и N_q' , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо, представляют собой выступающий нуклеотид;

p , q и q' , каждый, независимо, обозначают 0-6;

$n_p' > 0$ и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи;

каждый N_a и N_a' независимо представляют собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо немодифицированы, или их комбинации, где каждая последовательность включает по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

каждый N_b и N_b' независимо представляют собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо немодифицированы, или их комбинации;

XXX , YYY , ZZZ , $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ и $Z'Z'Z'$, каждый, независимо, представляют собой один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации представляют собой 2'-О-метил, гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA) или 2'-фтор модификации;

модификации N_b отличаются от модификации Y , и модификации N_b' отличаются от модификации Y' ; и

где смысловая цепь конъюгирована по крайней мере с одним лигандом, где, необязательно, лиганд является одним или несколько липофильными, например, C16, лиганды и/или одно или несколько производных GalNAc.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию аллеля APOE2, аллеля APOE3 и аллеля APOE4. В других вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию APOE4, но практически не ингибируют экспрессию APOE2 и APOE3, например, экспрессия APOE2 и APOE3 ингибируется не более чем на около 10%.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен агент двухцепочечной RNAi для ингибирования экспрессии гена APOE в клетке, где агент двухцепочечной RNAi включает смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь включает участок, комплементарный части mRNA, кодирующий APOE (SEQ ID NO: 1, или нуклеотидной последовательности по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности, например, на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичный полной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1), где каждая цепь имеет длину от около 14 до около 30 нуклеотидов, где агент двухцепочечной RNAi представлен формулой (III):

смысловая:	$5' n-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q 3'$
антисмысловая:	$3' n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q' 5' \text{ (III)}$

где:

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

каждый N_p , n_q , и N_q' , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляют собой выступающий нуклеотид;

p , q и q' , каждый, независимо, обозначают 0-6;

$n_p' > 0$ и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи;

каждый N_a и N_a' независимо представляют собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо немодифицированы, или их комбинации, где каждая последовательность включает по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

каждый N_b и N_b' независимо представляют собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо немодифицированы, или их комбинации;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z', каждый, независимо, представляют собой один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации представляют собой 2'-О-метил или 2'-фтор модификации;

модификации N_b отличаются от модификации Y, и модификации N_b' отличаются от модификации Y'; и

где смысловая цепь конъюгирована по крайней мере с одним лигандом, где, необязательно, лиганд является одним или несколько липофильными, например, C16, лиганды, и/или одно или несколько производных GalNAc.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию аллеля APOE2, аллеля APOE3 и аллеля APOE4. В других вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию APOE4, но практически не ингибируют экспрессию APOE2 и APOE3, например, экспрессия APOE2 и APOE3 ингибируется не более чем на около 10%.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к агенту двухцепочечной RNAi для ингибирования экспрессии гена APOE в клетке, где агент двухцепочечной RNAi включает смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь включает участок, комплементарный части mRNA, кодирующий APOE (SEQ ID NO: 1 или нуклеотидной последовательности по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности, например, на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичный полной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1), где каждая цепь имеет длину от около 14 до около 30 нуклеотидов, где агент двухцепочечной RNAi представлен формулой (III):

смысловая:	$5' n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q 3'$
антисмысловая:	$3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5' \text{ (III)}$

где:

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

каждый N_p , n_q , и N_q' , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляют собой выступающий нуклеотид;

p, q и q' , каждый, независимо, обозначают 0-6;

$n_p' > 0$ и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи;

каждый N_a и N_a' независимо представляют собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо немодифицированы, или их комбинации, где каждая последовательность включает по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

каждый N_b и N_b' независимо представляют собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо немодифицированы, или их комбинации;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z', каждый, независимо, представляют собой один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации представляют собой 2'-О-метил или 2'-фтор модификации;

модификации N_b отличаются от модификации Y, и модификации N_b' отличаются от модификации Y';

где смысловая цепь включает по меньшей мере один фосфоротиоатная связь; и

где смысловая цепь конъюгирована по крайней мере с одним лигандом, где, необязательно, лиганд является одним или несколько липофильными, например, C16, лиганды и/или одно или несколько производных GalNAc.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию аллеля APOE2, аллеля APOE3 и аллеля APOE4. В других вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию APOE4, но практически не ингибируют экспрессию APOE2 и APOE3, например, экспрессия APOE2 и APOE3 ингибируется не более чем на около 10%.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен агент двухцепочечной RNAi для ингибирования экспрессии гена APOE в клетке, где агент двухцепочечной RNAi включает смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь включает участок, комплементарный части mRNA, кодирующий APOE (SEQ ID NO: 1 или нуклеотидной последовательности по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности, например, на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичный полной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1), где каждая цепь имеет длину от около 14 до около 30 нуклеотидов, где агент двухцепочечной RNAi представлен формулой (III):

смысловая:	5' n_p - N_a -YYY- N_a - n_q 3'
антисмысловая:	3' n_p' - N_a' -Y'Y'Y'- N_a' - n_q' 5' (IIIa)

где:

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

p, q и q' , каждый, независимо, обозначают 0-6;

$n_p' > 0$ и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи;

каждый N_a и N_a' независимо представляют собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо немодифицированы, или их комбинации, где каждая последовательность включает по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

YYY и Y'Y'Y', каждый независимо, представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации представляют собой 2'-О-метил или 2'-фтор модификации;

где смысловая цепь включает по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь; и

где смысловая цепь конъюгирована по крайней мере с одним лигандом, где, необязательно, лиганд является одним или несколько липофильными, например, C16 лиганды, и/или одно или несколько производных GalNAc.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию аллеля APOE2, аллеля APOE3 и аллеля APOE4. В других вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию APOE4, но практически не ингибируют экспрессию APOE2 и APOE3, например, экспрессия APOE2 и APOE3 ингибируется не более чем на около 10%.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к агенту двухцепочечной RNAi для ингибирования экспрессии гена APOE, где агент двухцепочечной RNAi, нацеленный на APOE включает смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 и 9 или нуклеотидной последовательности по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности, например, на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной полной нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 или 9, и антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 и 10 или нуклеотидной последовательности по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности, например, на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной полной нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 и 10; где замена урацила на любой тимин в последовательностях, представленных SEQ ID NO: 1-10 (при сравнении выровненных последовательностей) не считается отличием, которое способствует отличию не более чем на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 1-10, где практически все нуклеотиды смысловой цепи включают модификацию, которая представляет собой 2'-О-метил-модификацию, GNA или 2'-фтор-модификацию, где смысловая цепь включает две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце,

где практически все нуклеотиды антисмысловой цепи включают модификацию, выбранную из группы, включающей 2'-О-метил-модификацию и 2'-фтор-модификацию, где антисмысловая цепь включает две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце, и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и где смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими липофильными, например, C16, лигандами, необязательно, дополнительно содержащими лиганд, нацеленный на печень, например, лиганд, содержащий одно или несколько производных GalNAc.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию аллеля APOE2, аллеля APOE3 и аллеля APOE4. В других вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию APOE4, но практически не ингибируют экспрессию APOE2 и APOE3, например, экспрессия APOE2 и APOE3 ингибируется не более чем на около 10%.

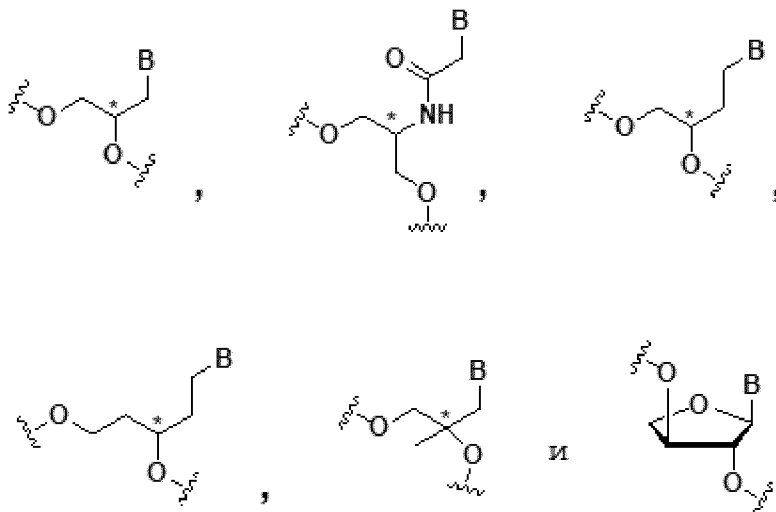
В другом аспекте настоящего изобретения предложен агент двухцепочечной RNAi для ингибирования экспрессии гена APOE, где агент двухцепочечной RNAi, нацеленный на APOE включает смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 и 9 или нуклеотидной последовательности по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности, например, на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной полной нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 или 9, и антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 и 10 или нуклеотидной последовательности по меньшей мере на 90% идентичной нуклеотидной последовательности, например, на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной полной нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 и 10, где замена урацила на любой тимин в последовательностях, представленных SEQ ID NO: 1-10 (при сравнении выровненных последовательностей) не считается отличием, которое способствует отличию не более чем на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 1-10; где смысловая цепь включает по меньшей мере один 3'-концевой дезокси-тимидин нуклеотид (dT), и где антисмысловая цепь включает по меньшей мере один 3'-концевой дезокси-тимидин нуклеотид (dT).

В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию аллеля APOE2, аллеля APOE3 и аллеля APOE4. В других вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию APOE4, но практически не ингибируют экспрессию APOE2 и APOE3, например, экспрессия APOE2 и APOE3 ингибируется не более чем на около 10%.

В одном варианте осуществления изобретения все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В другом варианте осуществления изобретения каждая цепь содержит 19-30 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь агента RNAi включает по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений 5'-области или его предшественника. Необязательно, термически дестабилизирующая модификация дуплекса представляет собой одну или несколько из



где В представляет собой азотистое основание.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена клетка, содержащая агент двухцепочечной RNAi по настоящему изобретению.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена APOE, которая включает агент двухцепочечной RNAi по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi вводят в незабуференном растворе. Необязательно, незабуференный раствор представляет собой физиологический раствор или воду.

В другом варианте осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi вводят с буферным раствором. Необязательно, буферный раствор включает ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В другом варианте осуществления изобретения буферный раствор представляет собой забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS).

В другом аспекте изобретения предложена фармацевтическая композиция, которая включает агент двухцепочечной RNAi по настоящему изобретению и липидный состав.

В одном варианте осуществления изобретения липидный состав включает липидную наночастицу (LNP).

В дополнительном аспекте изобретения предложен способ ингибирования экспрессии гена APOE в клетке, включающий: (а) приведение клетки в контакт с агентом двухцепочечной RNAi по настоящему изобретению или фармацевтической композицией по настоящему изобретению; и (б) выдерживание клетки, полученной на стадии (а), в течение

времени, достаточного для деградации транскрипта mRNA гена APOE, тем самым ингибируя экспрессию гена APOE в клетке.

В одном варианте осуществления изобретения клетка находится внутри организма субъекта. Необязательно, субъектом является человек.

В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект представляет собой макаку-резус, яванского макака, мышь или крысу.

В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект человек страдает нейродегенеративным заболеванием, связанным с APOE, например, опосредованным β -амилоидом заболеванием, таким как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и церебральная амилоидная ангиопатия, или тау-опосредованным заболеванием, например, первичной таупатией, такой как лобно-височная деменция (FTD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кордико базальная дегенерация (CBD), болезнь Пика (PiD), глобулярные глиальные таупатии (GGT), лобно-височная деменция с паркинсонизмом (FTDP, FTDP-17), хроническая травматическая энцефалопатия (СТЕ), кулачная деменция, лобно-височная долевая дегенерация (FTLD), аргирофильная зерновая болезнь (AGD) и первичная возрастная таупатия (PART) или вторичная таупатия, например, AD, болезнь Крейцфельда-Якоба, синдром Дауна и семейная британская деменция.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ дополнительно включает введение субъекту дополнительного терапевтического агента, такого как ингибиторы холинэстеразы и/или мемантин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi вводят в дозе от около 0.01 мг/кг до около 50 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi вводят субъекту интратекально.

В одном варианте осуществления изобретения способ снижает экспрессию гена APOE тканях головного (например, полосатого тела) или спинного мозга. Необязательно, Необязательно тканью головного или спинного мозга является полосатое тело, кора, мозжечок, шейный отдел позвоночника, поясничный отдел позвоночника или грудной отдел позвоночника.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi вводят субъекту подкожно.

В одном варианте осуществления изобретения способ снижает экспрессию гена APOE в печени.

В других вариантах осуществления изобретения способ снижает экспрессию гена APOE в печени и в головном мозге.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ ингибирования у субъекта экспрессии APOE, включающий: введение субъекту терапевтически эффективного количества агента двухцепочечной RNAi по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению, тем самым подавляя у субъекта экспрессию APOE.

В дополнительном аспекте изобретения предложен способ лечения или предупреждения у субъекта расстройства или нейродегенеративного заболевания или расстройства, связанного с АРОЕ, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества агента двухцепочечной RNAi по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению, тем самым осуществляя лечение или предупреждение у субъекта нейродегенеративного заболевания или расстройства, связанного с АРОЕ.

В некоторых вариантах осуществления изобретения АРОЕ-ассоциированное нейродегенеративное заболевание представляет собой амилоид- β -опосредованное заболевание, такое как амилоид- β -опосредованное заболевание, выбранное из группы, включающей болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и церебральная амилоидная ангиопатия.

В некоторых вариантах осуществления изобретения АРОЕ-ассоциированное нейродегенеративное заболевание представляет собой тау-опосредованное заболевание, такое как первичная таупатия или вторичная таупатия.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первичная таупатия выбрана из группы, включающей лобно-височную деменцию (FTD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кордикобазальную дегенерацию (CBD), болезнь Пика (PiD), глобулярные глиальные таупатии (GGT), лобно-височную деменцию с паркинсонизмом (FTDP, FTDP-17), хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ), кулачную деменцию, лобно-височную долевою дегенерацию (FTLD), аргирофильную зерновую болезнь (AGD) и первичную возрастную таупатию (PART).

В некоторых вариантах осуществления изобретения вторичная таупатия выбрана из группы, включающей AD, болезнь Крейтцфельда-Якоба, синдром Дауна и семейную британскую деменцию.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен набор для осуществления способа по настоящему изобретению, где набор содержит: а) агент двухцепочечной RNAi по настоящему изобретению и б) инструкции по применению, а также, с) необязательно, устройство для введения субъекту агента двухцепочечной RNAi.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен агент двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (RNAi) для ингибирования экспрессии гена АРОЕ, где агент RNAi имеет смысловую цепь и антисмысловую цепь, и где антисмысловая цепь включает участок комплементарности, которая включает по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов), например, по меньшей мере 15 нуклеотидов (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов), по меньшей мере 19 нуклеотидов (то есть отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов), от любой последовательности гетероциклических оснований нуклеиновых кислот антисмысловой цепи, из представленных в таблицах 2-5 и 7-10. В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi включает одну или несколько из следующих модификаций: 2'-О-

метил-модифицированный нуклеотид, 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, 2'-С-алкил-модифицированный нуклеотид, нуклеотид, содержащий гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), фосфоротиоат (PS) и винилфосфонат (VP). Необязательно, агент RNAi включает по меньшей мере одну из каждой из следующих модификаций: 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, 2'-С-алкил-модифицированный нуклеотид, нуклеотид, содержащий гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), фосфоротиоат и винилфосфонат (VP).

В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию аллеля APOE2, аллеля APOE3 и аллеля APOE4. В других вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi ингибируют экспрессию APOE4, но практически не ингибируют экспрессию APOE2 и APOE3, например, экспрессия APOE2 и APOE3 ингибируется не более чем на около 10%.

В другом варианте осуществления изобретения агент RNAi включает четыре или более PS модификаций, необязательно, от шести до десяти PS модификаций, необязательно, восемь PS модификаций.

В дополнительном варианте осуществления каждая из смысловой цепи и антисмысловой цепи агента RNAi имеет 5'-конец и 3'-конец, и агент RNAi включает восемь модификаций PS, расположенных на каждой из предпоследней и конечной межнуклеотидных связей из соответствующих 3'- и 5'-концах каждой смысловой и антисмысловой цепей агента RNAi.

В другом варианте осуществления изобретения каждая смысловая цепь и антисмысловая цепь агента RNAi включает 5'-конец и 3'-конец, и агент RNAi включает только один нуклеотид, включая GNA. Необязательно, нуклеотид, включающий GNA, расположен на антисмысловой цепи на седьмом нуклеотидном остатке от 5'-конца антисмысловой цепи.

В дополнительном варианте осуществления каждая смысловая цепь и антисмысловая цепь агента RNAi включает 5'-конец и 3'-конец, и агент RNAi включает от одного до четырех 2'-С-алкил-модифицированных нуклеотидов. Необязательно, 2'-С-алкил-модифицированный нуклеотид представляет собой 2'-C16-модифицированный нуклеотид. Необязательно, агент RNAi включает единственный 2'-С-алкил, например, C16-модифицированный нуклеотид. Необязательно, единственный 2'-С-алкил, например, C16-модифицированный нуклеотид расположен на смысловой цепи в шестом положении гетероциклического основания нуклеиновых кислот от 5'-конца смысловой цепи.

В другом варианте осуществления изобретения каждая смысловая цепь и антисмысловая цепь агента RNAi включает 5'-конец и 3'-конец, и агент RNAi включает два или более 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов. Необязательно, каждая смысловая цепь и антисмысловая цепь агента RNAi включает два или более 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов. Необязательно, 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды расположены на смысловой цепи в положениях 7, 9, 10 и 11 азотистых оснований от 5'-

конца смысловой цепи и на антисмысловой цепи в положениях 2, 14 и 16 азотистых оснований от 5'-конца антисмысловой цепи.

В дополнительном варианте осуществления каждая смысловая цепь и антисмысловая цепь агента RNAi включает 5'-конец и 3'-конец, и агент RNAi включает один или несколько VP модификаций. Необязательно, агент RNAi включает единственную VP модификацию на 5'-конце антисмысловой цепи.

В другом варианте осуществления изобретения каждая смысловая цепь и антисмысловая цепь агента RNAi включает 5'-конец и 3'-конец, и агент RNAi включает два или более 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов. Необязательно, агент RNAi включает 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды во всех положениях азотистых оснований, не модифицированные 2'-фтором, 2'-С-алкилом или гликолевой нуклеиновой кислотой (GNA). Необязательно, два или более 2'-О-метил-модифицированных нуклеотида расположены на смысловой цепи в положениях 1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и 21 от 5'-конца смысловой цепи и на антисмысловой цепи в положениях 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22 и 23 от 5'-конца антисмысловой цепи.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования экспрессии гена APOE в астроците. Способ включает приведение в контакт астроцита с агентом dsRNA или фармацевтической композицией по изобретению; и выдерживание продуцируемого астроцита в течение времени, для деградации транскрипта mRNA гена APOE, тем самым ингибируя экспрессию гена APOE в астроците.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка находится внутри организма субъекта, например, человека.

В некотором варианте осуществления изобретения приведение в контакт астроцита осуществляется путем интратекального введения фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь агента dsRNA содержит по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов отличающихся не более чем на три нуклеотида от любой из последовательностей нуклеотидов антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, включающей AD-1204704, AD-1204705, AD-1204708 и AD-1204712.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

На **фигуре 1А** представлен график, показывающий процент mRNA APOE, оставшейся в правом полушарии головного мозга (BRH) гомозиготных гуманизированных мышей с нокаутом APOE, которым вводили однократную дозу 300 мкг указанных дуплексов или искусственный CSF (aCSF) в качестве контроля путем интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV) на 14-й день после введения дозы.

На **фигуре 1В** представлен график, показывающий процент APOE mRNA, оставшейся в печени гомозиготных гуманизированных мышей с нокаутом APOE, которым вводили однократную дозу 300 мкг указанных дуплексов или искусственный CSF (aCSF) в качестве контроля путем интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV) на 14-й день после введения дозы.

На **фигуре 2** представлен график, показывающий корреляцию активности агентов AD-1204704, AD-1204705, AD-1204705, AD-1204706 AD-1204707, AD-1204708, AD-1204709, AD-1204710, AD-1204711, AD-1204712 и AD-1204713 *in vitro* с активностью агентов *in vivo*.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложены композиции RNAi, которые воздействуют на опосредованное RNA индуцированным комплексом молчания (RISC) расщепление RNA-транскриптов гена. Ген APOE может находиться в клетке, например, в клетке субъекта, такого как человек. В настоящем изобретении предложены также способы применения композиций RNAi по изобретению для ингибирования экспрессии гена APOE или для лечения субъекта, имеющего расстройство, при котором было бы полезно ингибировать или снижать экспрессию гена APOE, например, патогенного аллеля APOE, то есть APOE4, например, APOE- ассоциированного нейродегенеративного заболевания, например, амилоид- β -опосредованного заболевания или тау-опосредованного заболевания.

Агенты RNAi по изобретению включают цепь RNA (антисмысловая цепь), имеющую участок длиной около 30 нуклеотидов или меньше, например, длиной 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотидов, причем эта область по существу комплементарна по меньшей мере части транскрипта mRNA гена APOE. В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты RNAi по изобретению включают цепь RNA (антисмысловая цепь) имеющую участок длиной около 21-23 нуклеотида, причем эта область по существу комплементарна по меньшей мере части транскрипта mRNA гена APOE.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты RNAi по изобретению включают цепь RNA (антисмысловая цепь), которая может включать более длинные цепи, например, до 66 нуклеотидов, например, длиной 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 нуклеотидов с участком из по меньшей мере 19 примыкающих друг к другу нуклеотидов, который по существу комплементарен по меньшей мере части транскрипта mRNA гена APOE. Эти агенты RNAi с более длинными антисмысловыми цепями, предпочтительно, включают вторую цепь RNA (смысловая цепь) длиной 20-60 нуклеотидов, где смысловая и антисмысловая цепи образуют дуплекс из 18-30 примыкающих друг к другу нуклеотидов.

Применение этих агентов RNAi делает возможным целенаправленную деградацию mRNA гена APOE у млекопитающих. Таким образом, способы и композиции, включающие эти агенты RNAi, могут быть использованы для лечения субъекта, у которого было бы полезно снижение уровней или активности белка APOE, такого как субъект, страдающий нейродегенеративным заболеванием, связанным с APOE, например, амилоид- β -опосредованным заболеванием или тау-опосредованным заболеванием.

Следующее подробное описание раскрывает способы получения и применения композиций, содержащих агенты RNAi, для ингибирования экспрессии гена APOE, а также композиции и способы лечения субъектов, страдающих заболеваниями и нарушениями, при которых было бы полезно ингибировать или снижать экспрессию генов.

I. Определения

Для того чтобы настоящее изобретение можно было легче понять, сначала даны определения некоторых терминов. Кроме того, следует отметить, что всякий раз, когда указывается значение или диапазон значений параметра, предполагается, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к указанным значениям, также должны быть частью этого изобретения.

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

Термин «включая» используется в настоящем документе для обозначения и используется взаимозаменяемо с фразой «включая, но не ограничиваясь этим». Термин «или» используется в настоящем документе для обозначения и используется взаимозаменяемо с термином «и/или», если контекст явно не указывает на иное.

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

Термин «по меньшей мере», «не менее чем» или «или более» перед числом или серией чисел понимается как включающее число, соседнее с термином «по меньшей мере», и все последующие числа или целые числа, которые могут быть логически включать, как ясно из контекста. Например, количество нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты должно быть целым числом. Например, «по меньшей мере 18 нуклеотидов из 21-нуклеотидной молекулы нуклеиновой кислоты» означает, что 18, 19, 20 или 21 нуклеотид обладают указанным свойством. Когда «по меньшей мере» присутствует перед рядом чисел или диапазоном, подразумевается, что «по меньшей мере» может модифицировать каждое из чисел в ряду или диапазоне.

Как используется в настоящем изобретении, «не более чем» или «менее» понимаются как значение, примыкающее к фразе, и логические меньшие значения или целые числа, как логические из контекста, равные нулю. Например, дуплекс с выступающим «не более 2 нуклеотидов» имеет выступающий конец в 2, 1 или 0 нуклеотидов. Когда «не более чем» присутствует перед рядом чисел или диапазоном, подразумевается, что «не более чем» может изменить каждое из чисел в ряду или диапазоне.

Как используется в настоящем изобретении, способы обнаружения могут включать определение того, что количество присутствующего аналита ниже уровня обнаружения способом.

В случае конфликта между указанным сайтом-мишенью и нуклеотидной последовательностью смысловой или антисмысловой цепи указанная последовательность имеет приоритет.

В случае противоречия между химической структурой и химическим названием химическая структура имеет приоритет.

Термины «АРОЕ» или «АРОЕ», также известные как «аполипопротеин Е», «болезнь Альцгеймера 2», «LPG» и «LDLCQ5», относятся к хорошо известному гену, который кодирует белок, АРОЕ. АРОЕ синтезируется во всем организме, в первую очередь в печени, и функционирует как липидный транспортный белок и является основным лигандом для рецепторов липопротеинов низкой плотности (LDL). Было показано, что АРОЕ играет роль в метаболизме холестерина и сердечно-сосудистых заболеваниях, а в последнее время он стал основным фактором риска болезни Альцгеймера и связан с патологией других нейродегенеративных заболеваний.

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности АРОЕ можно найти, например, в GenBank под номером доступа NM_000041.4 (*Homo sapiens* АРОЕ, SEQ ID NO: 1, обратный комплемент, SEQ ID NO: 2); номер доступа в GenBank NM_001270681.1 (*Rattus norvegicus* АРОЕ, SEQ ID NO: 3; обратный комплемент, SEQ ID NO: 4); номер доступа в GenBank NM_001305843.1 (*Mus musculus* АРОЕ, SEQ ID NO: 5, обратный комплемент, SEQ ID NO: 6); номер доступа в GenBank XM_028839202.1 (*Macaca mulatta* АРОЕ, SEQ ID NO: 7, обратный комплемент, SEQ ID NO: 8); и номер доступа в GenBank XM_005589554.2 (*Macaca fascicularis* АРОЕ, SEQ ID NO: 9; обратный комплемент, SEQ ID NO: 10).

Дополнительные примеры последовательностей АРОЕ можно найти в общедоступных базах данных, например, GenBank, OMIM и UniProt. Дополнительную информацию об АРОЕ можно найти, например, на сайте www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/348.

Термин АРОЕ, как используется в настоящем изобретении, также относится к вариациям гена АРОЕ, включая варианты АРОЕ человека, представленные в базе данных SNP, например, по адресу [ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=APOE\[gene\]](http://ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=APOE[gene]).

Ген АРОЕ человека содержит два однонуклеотидных полиморфизма, которые приводят к трем наиболее распространенным вариантам: АРОЕ2 (также обозначаемый как АРОЕ*ε2 или ε2; Cys112, Cys158), АРОЕ3 (также обозначаемый как АРОЕ*ε3 или ε3; Cys112, Arg 158) и АРОЕ4 (также обозначаемый как АРОЕ*ε4 или ε4 (Arg112, Arg158). Номер доступа в GenBank NM_000041.4 (*Homo sapiens* АРОЕ, SEQ ID NO: 1, обратный комплемент, SEQ ID NO: 2) представляет собой нуклеотидную последовательность варианта АРОЕ*ε3 (АРОЕ3); вариант АРОЕ*ε2 (АРОЕ2) имеет однонуклеотидное изменение в нуклеотиде 595C>T SEQ ID NO:1 и вариант АРОЕ*ε4 (АРОЕ4) имеет однонуклеотидное изменение в нуклеотиде 457T>C SEQ ID NO:1.

Следует понимать, что, если не указано иное в настоящем документе, термин «APOE», «ApoE» или тому подобное относится к любому одному или нескольким из трех вариантов или аллелей APOE. Например, используемый в настоящем документе термин «ген APOE» относится к аллелю APOE2, аллелю APOE3 и/или аллелю APOE4», тогда как термин «аллель APOE4» или тому подобное относится только к аллелю APOE4.

Как используется в настоящем изобретении, «последовательность-мишень» относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы mRNA, образованной во время транскрипции гена APOE, включая mRNA, которая является продуктом процессинга RNA первичного продукта транскрипции. В одном варианте осуществления изобретения мишеневая часть последовательности будет по меньшей мере достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для RNAi-направленного расщепления в той или иной части нуклеотидной последовательности молекулы mRNA, образованной во время транскрипции гена APOE.

Мишеневая последовательность имеет длину около 15-30 нуклеотидов. Например, мишеневая последовательность может состоять примерно из 15-30 нуклеотидов, длиной 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения мишеневая последовательность имеет длину 19-23 нуклеотидов, необязательно, 21-23 нуклеотидов. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к указанным выше диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть изобретения.

Как используется в настоящем изобретении, термин «цепь, содержащая последовательность» относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которая описывается последовательностью, на которую ссылаются, с использованием стандартной номенклатуры нуклеотидов.

«G», «C», «A», «T» и «U» обычно обозначают нуклеотид, содержащий в качестве основания гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил, соответственно, в контексте модифицированного или немодифицированного нуклеотида. Однако следует понимать, что термин «рибонуклеотид» или «нуклеотид» может также относиться к модифицированному нуклеотиду, как более подробно описано ниже, или к суррогатной замещающей части (смотри, например, таблицу 1). Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил могут быть заменены другими фрагментами без существенного изменения свойств спаривания оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такой фрагмент замены. Например, без ограничения, нуклеотид, содержащий в качестве основания инозин, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть заменены в нуклеотидных последовательностях двухцепочечной RNA, представленных в описании, нуклеотидом,

содержащим, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любом месте олигонуклеотида могут быть заменены гуанином и урацилом, соответственно, с образованием пары оснований G-U Wobble с mRNA-мишенью. Последовательности, содержащие такие замещающие фрагменты, подходят для композиций и способов, представленных в описании.

Термины «iRNA», «агент RNAi», «агент iRNA», «агент RNAi», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к агенту, который содержит RNA, как этот термин определен в данном документе, и который опосредует направленное расщепление транскрипта RNA посредством пути RNA-индуцированного комплекса молчания (RISC). RNA-интерференция (RNAi) представляет собой процесс, который направляет специфичную для последовательности деградацию mRNA. RNAi модулирует, например, ингибирует экспрессию APOE в клетке, например, в клетке субъекта, такого как субъект-млекопитающее.

В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi по изобретению включает одноцепочечную RNAi, которая взаимодействует с последовательностью RNA-мишени, например, последовательность mRNA-мишени APOE, направляя расщепление RNA-мишени. Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что длинная двухцепочечная RNA, введенная в клетки, расщепляется на двухцепочечные короткие интерферирующие RNA (siRNA), включающие смысловую и антисмысловую цепи, с помощью эндонуклеазы типа III, известной как Dicer (Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, фермент, подобный рибонуклеазе-III, перерабатывает эти dsRNA в короткие интерферирующие RNA из 19-23 пар оснований с характерными двумя выступами на 3'-конце (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). Затем эти siRNA включают в RNA-индуцированный сайленсинговый комплекс (RISC), где одна или несколько геликаз раскручивают дуплекс siRNA, позволяя комплементарной антисмысловой цепи направлять распознавание мишени (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). При связывании с соответствующей mRNA-мишенью одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень, вызывая сайленсинг (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188). Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к одноцепочечной RNA (ssRNA) (антисмысловая цепь дуплекса siRNA), генерируемой в клетке и способствующей образованию комплекса RISC для ингибирования гена-мишени, то есть гена APOE. Соответственно, термин «siRNA» также используется в данном документе для обозначения RNAi, как описано выше.

В другом варианте осуществления изобретения агент RNAi может представлять собой одноцепочечную RNA, которую вводят в клетку или организм для ингибирования mRNA-мишени. Агенты одноцепочечной RNAi связываются с эндонуклеазой RISC, Argonaute 2, которая затем расщепляет mRNA-мишень. Одноцепочечные siRNA обычно состоят из 15-30 нуклеотидов и химически модифицированы. Дизайн и тестирование одноцепочечных RNA описаны в патенте США № 8101348 и Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894, полное содержание каждого из указанных включено в настоящее описание

посредством ссылки. Любая из антисмысловых нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе, может быть использована в виде одноцепочечной siRNA, как описано в настоящем документе, или химически модифицирована способами, описанными Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894.

В другом варианте осуществления изобретения «агент RNAi» для применения в композициях и способах настоящего изобретения представляет собой двухцепочечную RNA и упоминается в настоящем документе как «агент двухцепочечной RNAi», «молекула двухцепочечной RNA (dsRNA)», «агент dsRNA» или «dsRNA». Термин «dsRNA» относится к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющих дуплексную структуру, состоящую из двух антипараллельных и по существу комплементарных цепей нуклеиновой кислоты, имеющих «смысловую» и «антисмысловую» ориентацию по отношению к целевой RNA, то есть гену APOE. В некоторых вариантах осуществления изобретения двухцепочечная RNA (dsRNA) запускает деградацию RNA-мишени, например, mRNA, посредством механизма посттранскрипционного ингибирования генов, именуемого в настоящем документе RNA-интерференцией или RNAi.

Как правило, молекула dsRNA может включать рибонуклеотиды, но, как подробно описано в настоящем документе, каждая или обе цепи могут также включать один или несколько нерибонуклеотидов, например, дезоксирибонуклеотид, модифицированный нуклеотид. Кроме того, как используется в данном описании, «агент RNAi» может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; агент RNAi может включать существенные модификации нескольких нуклеотидов. Как используется в настоящем изобретении, термин «модифицированный нуклеотид» относится к нуклеотиду, имеющему независимо модифицированный сахарный фрагмент, модифицированную межнуклеотидную связь или модифицированное азотистое основание. Таким образом, термин «модифицированный нуклеотид» охватывает замены, добавления или удаления, например, функциональной группы или атома в межнуклеозидных связях, фрагментах сахара или азотистых основаниях. Модификации, подходящие для использования в агентах по настоящему изобретению, включают все типы модификаций, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники. Любые такие модификации, используемые в молекуле типа siRNA охватываются термином «агент RNAi» для целей настоящего описания и формулы изобретения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения включение дезоксинуклеотида, который признан природной формой нуклеотида, если он присутствует в агенте RNAi, может рассматриваться как составляющий модифицированный нуклеотид.

Участок дуплекса может иметь любую длину, которая обеспечивает специфическую деградацию желаемой RNA-мишени посредством пути RISC, и может иметь длину около от 15 до 36 пар оснований, например, длиной около 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 пар оснований, например, длиной около 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-

27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, или 21-22 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления изобретения участок дуплекса имеет в длину 19-21 пар оснований, например, длиной 21 пар оснований. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к указанным выше диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть изобретения.

Две цепи, образующие дуплексную структуру, могут быть разными частями одной большей молекулы RNA или отдельными молекулами RNA. Если две цепи являются частью одной большей молекулы и, следовательно, связаны непрерывной цепочкой нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образуя дуплексную структуру, соединительная цепь RNA называется «петля шпильки». Петля шпильки может содержать по меньшей мере один неспаренный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления петля шпильки может содержать по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 23 или более неспаренных нуклеотидов или нуклеотидов, не направленных к целевому сайту dsRNA. В некоторых вариантах осуществления изобретения петля шпильки может состоять из 10 или менее нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения петля шпильки может состоять из 8 или менее неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения петля шпильки может состоять из 4-10 неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения петля шпильки может состоять из 4-8 нуклеотиды.

Когда две по существу комплементарные цепи dsRNA состоят из отдельных молекул RNA, эти молекулы не обязательно должны быть ковалентно связаны, но могут быть связаны. В некоторых вариантах осуществления изобретения, где две цепи соединены ковалентно с помощью средств, отличных от непрерывной цепи нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующей дуплексную структуру, соединительная структура называется «линкер» (хотя следует отметить, что некоторые другие структуры, определенные в других местах настоящего документа, также могут называться «линкером»). Цепи RNA могут иметь одинаковое или разное количество нуклеотидов. Максимальное количество пар оснований равно количеству нуклеотидов в самой короткой цепи dsRNA за вычетом любых выступов, присутствующих в дуплексе. В дополнение к дуплексной структуре RNAi может содержать один или несколько выступающих нуклеотидов. В одном варианте агента RNAi по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере из 1 нуклеотида. В другом варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В других вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одна цепь агента RNAi содержит а 5' выступ по меньшей мере из 1 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одна цепь содержит 5' выступ по меньшей мере из 2

нуклеотидов, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В еще других вариантах осуществления изобретения оба 3' и 5' конца цепи агента RNAi содержат выступ по меньшей мере из 1 нуклеотида.

В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi по изобретению представляет собой dsRNA, каждая цепь которой независимо содержит 19-23 нуклеотида, которая взаимодействует с последовательностью RNA-мишени, например, последовательность mRNA-мишени APOE, направляя расщепление RNA-мишени.

Как используется в настоящем изобретении, термин «нуклеотидный выступ» относится по меньшей мере к одному неспаренному нуклеотиду, выступающему из дуплексной структуры агента RNAi, например, dsRNA. Например, когда 3'-конец одной цепи dsRNA выходит за пределы 5'-конца другой цепи или наоборот, имеется нуклеотидный выступ. dsRNA может содержать выступ по меньшей мере из одного нуклеотида; альтернативно, выступающий конец может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или более. Нуклеотидный выступ может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Выступ(ы) может быть на смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотиды выступа могут находиться на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах либо антисмысловой, либо смысловой цепи dsRNA.

В одном варианте осуществления изобретения антисмысловая цепь dsRNA имеет 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, выступающих на 3'-конце или на 5'-конце. В одном варианте осуществления изобретения смысловая цепь dsRNA имеет 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, выступающих на 3'-конце или на 5'-конце. В другом варианте осуществления изобретения один или несколько нуклеотидов на выступе заменены нуклеозидтиофосфатом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь dsRNA имеет 1-10 нуклеотидов, например, 0-3, 1-3, 2-4, 2-5, 4-10, 5-10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, выступающих на 3'-конце или на 5'-конце. В одном варианте осуществления изобретения смысловая цепь dsRNA имеет 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, выступающих на 3'-конце или на 5'-конце. В другом варианте осуществления изобретения один или несколько нуклеотидов на выступе заменены нуклеозидтиофосфатом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выступ на смысловой цепи или антисмысловая цепь может включать удлиненные участки длиной более 10 нуклеотидов, например, 1-30 нуклеотидов, 2-30 нуклеотидов, 10-30 нуклеотидов или 10-15 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения удлиненный выступ имеется на смысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления изобретения удлиненный выступ имеется на 3' конце смысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления изобретения удлиненный выступ имеется на 5' конце смысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления изобретения удлиненный выступ имеется

на антисмысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления изобретения удлиненный выступ имеется на 3' конце антисмысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления изобретения удлиненный выступ имеется на 5' конце антисмысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько нуклеотидов на выступе заменены нуклеозидтиофосфатом. В некоторых вариантах осуществления изобретения выступ включает самодополняющую часть, так что выступ способен образовывать шпилькообразную структуру, стабильную в физиологических условиях.

Термины «тупой» или «тупой конец», используемые в данном документе в отношении двухцепочечной RNA, означают, что в данной концевой области двухцепочечной RNA нет неспаренных нуклеотидов или аналогов нуклеотидов, то есть нет выступающего нуклеотида. Один или оба конца dsRNA могут быть тупыми. Когда оба конца dsRNA являются тупыми, говорят, что dsRNA имеет тупые концы. Для ясности, dsRNA с «тупыми концами» представляет собой dsRNA, которая является тупой на обоих концах, то есть не имеет выступающих нуклеотидов на обоих концах молекулы. Чаще всего такая молекула будет двухцепочечной по всей своей длине.

Термин «антисмысловая цепь» или «направляющая цепь» относится к цепи агента RNAi, например, dsRNA, которая включает область, по существу комплементарную последовательности мишени, например, mRNA APOE.

Как используется в настоящем изобретении, термин «участок комплементарности» относится к участку антисмысловой цепи, который по существу комплементарен последовательности, например последовательности мишени, например, последовательности нуклеотидов APOE, определенной в настоящем документе. Если область комплементарности не полностью комплементарна целевой последовательности, несовпадения могут быть во внутренних или концевых областях молекулы. Как правило, наиболее допустимые несовпадения находятся в терминальных областях, например, в пределах 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов от 5'- или 3'-конца агента RNAi.

Термин «смысловая цепь» или «цепь-пассажир», как используют в настоящем документе, относится к цепи агента RNAi, которая включает область, которая по существу комплементарна области антисмысловой цепи, как этот термин определен в настоящем документе.

Как используется в настоящем изобретении, термин «область расщепления» относится к области, расположенной непосредственно рядом с сайтом расщепления. Сайт расщепления представляет собой сайт на мишени, на котором происходит расщепление. В некоторых вариантах осуществления изобретения область расщепления содержит три основания на каждом конце сайта расщепления и непосредственно рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления изобретения область расщепления содержит два основания на каждом конце сайта расщепления и непосредственно рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт расщепления конкретно находится

в сайте, связанном с нуклеотидами 10 и 11 антисмысловой цепи, и область расщепления содержит нуклеотиды 11, 12 и 13.

Как используют в рамках изобретения и если нет иных указаний, термин «комплементарный», когда его используют для описания первой нуклеотидной последовательности в отношении второй нуклеотидной последовательности, относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, гибридизоваться и образовывать дуплексную структуру в определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, как будет понятно специалисту в данной области.

Комплементарные последовательности в агенте RNAi, например, в dsRNA, как описано в настоящем документе, включают спаривание оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, на протяжении всей длины одной или обеих нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности в настоящем описании могут быть обозначены как «полностью комплементарные» в отношении друг друга. Однако, когда первую последовательность обозначают в настоящем описании как «по существу комплементарная» в отношении второй последовательности, две последовательности могут быть полностью комплементарными, или они при гибридизации могут образовывать одну или несколько, но обычно не более 5, 4, 3 или 2 несоответствующих пар оснований, для дуплекса из вплоть до 30 пар оснований, при сохранении способности гибридизоваться в условиях, в наибольшей степени соответствующих их конечному применению, например, ингибированию экспрессии генов через каскад RISC. Однако когда два олигонуклеотида сконструированы так, чтобы они при гибридизации образовывали один или несколько одноцепочечных выступающих концов, такие выступления не будут считаться несоответствиями с точки зрения определения комплементарности. Например, dsRNA, содержащая один олигонуклеотид длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид длиной 23 нуклеотида, где более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, все еще может называться «полностью комплементарной» для целей, описанных в настоящем документе.

"Комплементарные" последовательности, как используется в настоящем изобретении, также могут включать или могут быть образованы полностью из пар оснований, не являющихся парами оснований Уотсона-Крика, и/или пар оснований, образованных из неприродных и модифицированных нуклеотидов, при условии, что указанные выше требования в отношении их способности гибридизоваться удовлетворяются. Такие пары оснований, не являющиеся парами оснований Уотсона-Крика, включают, но не ограничиваются ими, «качающиеся» пары оснований G:U или хугстиновские пары оснований.

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

Как используется в настоящем изобретении, полинуклеотид, который является «по существу комплементарным по меньшей мере части матричной RNA (mRNA), относится к полинуклеотиду, который по существу комплементарен непрерывной части представляющей интерес mRNA (например, mRNA кодирующей APOE). Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части mRNA APOE, если последовательность по существу комплементарна непрерывной части mRNA, кодирующей APOE.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотиды антисмысловой цепи, описанные в настоящем документе, полностью комплементарны целевой последовательности APOE. В других вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь полинуклеотиды антисмысловой цепи, описанные в настоящем документе, по существу комплементарны целевой последовательности APOE и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по крайней мере примерно на 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентному участку нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 или 9 для APOE, или фрагменту SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 или 9 для APOE, например, комплементарна на около 85%, на около 86%, на около 87%, на около 88%, на около 89%, на около 90%, на около 91%, на около 92%, на около 93%, на около 94%, на около 95%, на около 96%, на около 97%, на около 98% или на около 99%.

В других вариантах осуществления изобретения антисмысловые полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, в значительной степени комплементарны целевой последовательности APOE и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по крайней мере на около 80% комплементарна по всей своей длине любой нуклеотидной последовательности смысловой цепи из указанных в любой таблице 2-5 и 7-10 для APOE, или фрагменту любой нуклеотидно последовательности смысловой цепи из указанных в любой таблице 2-5 и 7-10 для APOE, например, комплементарна на около 85%, на около 86%, на около 87%, на около 88%, на около 89%, на около 90%, на около 91%, на около 92%, на около 93%, на около 94%, на около 95%, на около 96%, на около 97%, на около 98%, или на около 99%.

В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi по изобретению включает смысловую цепь, которая по существу комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, является таким же, как последовательность-мишень APOE, и где полинуклеотид смысловой цепи содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по крайней мере примерно на 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентному участку нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 4,

6, 8 или 10, или фрагменту любой SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 или 10, например, комплементарна на около 85%, на около 86%, на около 87%, на около 88%, на около 89%, на около 90%, на около 91%, на около 92%, на около 93%, на около 94%, на около 95%, на около 96%, на около 97%, на около 98%, или на около 99%.

В одном варианте осуществления изобретения по меньшей мере частичное ингибирование экспрессии гена APOE оценивают по снижению количества mRNA APOE, которое может быть выделено из или обнаружено в первой клетке или группе клеток, в которых ген APOE транскрибируется, и которые обработали так, чтобы экспрессия гена APOE ингибировалась, по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичной первой клетке или группе клеток, но которая не была обработана таким образом (контрольные клетки). Степень ингибирования можно выражать в значениях:

$$\frac{(\text{mRNA в контрольной клетке}) - (\text{mRNA в обработанной клетке})}{(\text{mRNA в контрольной клетке})} \cdot 100\%$$

Выражение «приведение клетки в контакт с агентом RNAi», таким как dsRNA, как используется в настоящем изобретении, включает приведение клетки в контакт любым возможным способом. Приведение клетки в контакт с агентом RNAi включает приведение клетки в контакт *in vitro* с агентом RNAi или приведение клетки в контакт *in vivo* с агентом RNAi. Приведение в контакт можно проводить прямо или непрямо. Таким образом, например, агент RNAi можно приводить в физический контакт с клеткой путем индивидуального выполнения способа или, альтернативно, агент RNAi можно помещать в условия, которые позволят или обеспечат впоследствии ее приведение в контакт с клеткой.

Приведение клетки в контакт *in vitro* можно проводить, например, путем инкубации клетки с агентом RNAi. Приведение клетки в контакт *in vivo* можно проводить, например, путем инъекции агента RNAi в ткань или вблизи ткани, где расположена клетка, или путем инъекции средства RNAi в другую область, например, в центральную нервную систему (ЦНС), необязательно путем интратекальной, интравитреальной или другой инъекции, или в кровотоки или в подкожное пространство, таким образом, что агент впоследствии достигнет ткани, где расположена клетка, с которой необходимо связаться. Например, агент RNAi может содержать или может быть связано с лигандом, например, липофильным фрагментом или фрагментами, как описано ниже и дополнительно подробно описано, например, в PCT/US2019/031170, который включен в настоящий документ в качестве ссылки, который направляет или иным образом стабилизирует агент RNAi в интересующем месте, например, в ЦНС. В некоторых вариантах осуществления изобретения агент RNAi может содержать или быть связан с лигандом, например, одним или несколькими производными GalNAc, как описано ниже, который направляет или иным образом стабилизирует агент RNAi в представляющем интерес участке, например, в печени. В других вариантах осуществления изобретения агент RNAi может содержать или быть связано с липофильным фрагментом или фрагментами и одним или несколькими производными GalNAc. Также возможны комбинации методов контактирования *in vitro* и

in vivo способы. Например, клетка также может быть приведена в контакт *in vitro* с агентом RNAi и впоследствии трансплантирована субъекту.

В одном варианте осуществления изобретения приведение клетки в контакт с агентом RNAi «введение» или «доставку агента RNAi в клетку» путем облегчения или осуществления поглощения или абсорбции клеткой. Поглощение или поглощение агента RNAi может происходить через диффузионные или активные клеточные процессы без посторонней помощи или с помощью вспомогательных агентов или устройств. Введение агента RNAi в клетку может осуществляться *in vitro* или *in vivo*. Например, для введения агента RNAi можно инъецировать в участок ткани или вводить системно. Введение *in vitro* включает способы, известные в данной области техники, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны ниже или известны в данной области техники.

Термин «липофильный» или «липофильный фрагмент» в широком смысле относится к любому соединению или химическому фрагменту, обладающему сродством к липидам. Одним из способов характеристики липофильности липофильной части является коэффициент распределения октанол-вода, $\log K_{ow}$, где K_{ow} представляет собой отношение концентрации химического вещества в октанольной фазе к его концентрации в водной фазе двухфазной системы при равновесии. Коэффициент распределения октанол-вода представляет собой лабораторно измеряемое свойство вещества. Однако его также можно предсказать, используя коэффициенты, относящиеся к структурным компонентам химического вещества, которые рассчитываются с использованием первопринципных или эмпирических методов (см., например, работу Tetko *et al.*, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 41:1407-21 (2001), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки). Он обеспечивает термодинамическую меру тенденции вещества предпочитать неводную или маслянистую среду, а не воду (то есть его гидрофильный/липофильный баланс). В принципе, химическое вещество является липофильным по своему характеру, если его $\log K_{ow}$ превышает 0. Как правило, липофильная часть имеет $\log K_{ow}$ превышает 0. Как правило, липофильная часть имеет $\log K_{ow}$ превышающий 1, превышающий 1.5, превышающий 2, превышающий 3, превышающий 4, превышающий 5 или превышающий 10. Например, прогнозируется, что $\log K_{ow}$ для 6-аминогексанола составляет приблизительно 0,7. Используя тот же способ, $\log K_{ow}$ холестерина N-(гексан-6-ол) карбамата прогнозируется равным 10,7.

Липофильность молекулы может меняться в зависимости от функциональной группы, которую она несет. Например, добавление гидроксильной группы или аминогруппы к концу липофильного фрагмента может увеличить или уменьшить значение коэффициента распределения (например, $\log K_{ow}$) липофильного фрагмента.

Альтернативно, гидрофобность агента двухцепочечной RNAi, конъюгированного с одной или несколькими липофильными фрагментами, можно измерить по его характеристикам связывания с белком. Например, в некоторых вариантах осуществления можно определить, что несвязанная фракция в анализе связывания с белками плазмы агента

двухцепочечной RNAi положительно коррелирует с относительной гидрофобностью агента двухцепочечной RNAi, которая затем может положительно коррелировать с подавляющей активностью агента двухцепочечной RNAi.

В одном варианте осуществления изобретения определенный анализ связывания с белками плазмы представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности (EMSA) с использованием белка сывороточного альбумина человека. Типовой протокол этого анализа связывания подробно проиллюстрирован, например, в PCT/US2019/031170. Гидрофобность агента двухцепочечной RNAi, измеренная по доле несвязанной dsRNA в анализе связывания превышает 0,15, превышает 0,2, превышает 0,25, превышает 0,3, превышает 0,35, превышает 0,4, превышает 0,45 или превышает 0,5 для усиленной доставки dsRNA *in vivo*.

Соответственно, конъюгирование липофильных фрагментов с внутренним положением(ями) агента двухцепочечной RNAi обеспечивает оптимальную гидрофобность для усиленной доставки siRNA *in vivo*.

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

Как используется в настоящем изобретении, термин «субъект» представляет собой животное, такое как млекопитающее, включая примата (например, человека, нечеловеческого примата, например, обезьяну и шимпанзе) или непримата (например, крысу или мышь). В предпочтительном варианте осуществления изобретения субъектом является человек, например, человек, которого лечат или оценивают по поводу заболевания, расстройства или состояния, при котором было бы полезно снижение экспрессии APOE; человек с риском заболевания, расстройства или состояния, при котором может помочь снижение экспрессии APOE; человек, страдающий заболеванием, расстройством или состоянием, при котором было бы полезно снижение экспрессии APOE; или человек, которого лечат от заболевания, расстройства или состояния, при котором было бы полезно снижение экспрессии APOE, как описано в настоящем документе.

Как используется в настоящем изобретении, термины «лечение» или «излечение» относятся к полезному или желаемому результату, включая, помимо прочего, облегчение или улучшение одного или нескольких признаков или симптомов, связанных с экспрессией гена APOE или продукцией белка APOE, например, APOE-ассоциированное нейродегенеративное заболевание, такое как амилоид- β -опосредованное заболевание, например, болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и церебральная амилоидная ангиопатия, или тау-опосредованное заболевание, например, первичная таупатия, такая как лобно-височная деменция, прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кордикобазальная дегенерация (CBD), болезнь Пика (PiD), хроническая травматическая энцефалопатия (СТЕ),

лобно-височная деменция (FTD, FTDP-17), лобно-височная долевая дегенерация (FTLD), аргирофильная зерновая болезнь (AGD), первичная возрастная таупатия (PART) и глобулярные глиальные таупатии (GGT), или вторичная таупатия, например, AD, болезнь Крейтцфельда-Якоба, синдром Дауна, семейная британская деменция, и кулачная деменция. Лечение» также может означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения.

Термин «более низкий» в контексте уровня APOE у субъекта или маркера или симптома заболевания относится к статистически значимому снижению такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, %, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения снижение составляет по меньшей мере 20%. В некоторых вариантах осуществления изобретения снижение маркера заболевания, например, уровня экспрессии белка или гена, составляет по меньшей мере 50%. «Ниже» в контексте уровня APOE у субъекта предпочтительно ниже уровня, принятого в качестве нормального для индивидуума без такого расстройства. В некоторых вариантах осуществления изобретения «ниже» представляет собой уменьшение разницы между уровнем маркера или симптома у субъекта, страдающего заболеванием, и уровнем, приемлемым в диапазоне нормы для индивидуума, например, уровнем снижения веса тела у индивидуума с ожирением относительно индивидуума, вес которого находится в пределах нормы. Как используется в настоящем изобретении, снижение может относиться к снижению или преимущественному снижению уровня mRNA гена APOE, имеющего экспансию нуклеотидных повторов.

Как используется в настоящем изобретении, термин «предупреждение» или «предупреждая», когда он используется в отношении заболевания, расстройства или состояния, при котором может помочь снижение экспрессии гена APOE или продукции белка APOE, относится к снижению вероятности того, что у субъекта разовьется симптом, связанный с таким заболеванием, расстройством или состоянием, например, симптом APOE-ассоциированного нейродегенеративного заболевания. Отсутствие развития заболевания, расстройства или состояния или уменьшение развития симптома, связанного с таким заболеванием, расстройством или состоянием (например, по меньшей мере примерно на 10% по клинически принятой шкале для этого заболевания или расстройства), или проявление отсроченных симптомов (например, на дни, недели, месяцы или годы) считается эффективным предупреждением.

Как используется в настоящем изобретении, термин «APOE-ассоциированное нейродегенеративное заболевание» или «APOE-ассоциированное нейродегенеративное расстройство» понимается как любое заболевание или расстройство, при котором было бы полезно снижение экспрессии и/или активности APOE. Примеры APOE-ассоциированных нейродегенеративных заболеваний включают амилоид- β -опосредованные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и церебральная амилоидная ангиопатия, и тау-опосредованные заболевания, например, первичные таупатии, такие как лобно-

височная деменция (FTD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кордикобазальная дегенерация (CBD), болезнь Пика (PiD), глобулярные глиальные таупатии (GGT), лобно-височная деменция с паркинсонизмом (FTDP, FTDP-17), хроническая травматическая энцефалопатия (СТЕ), кулачная деменция, лобно-височная долевая дегенерация (FTLD), аргирофильная зерновая болезнь (AGD) и первичная возрастная таупатия (PART), и вторичные таупатии, например, AD, болезнь Крейтцфельда-Якоба, синдром Дауна и семейная британская деменция.

Как используется в настоящем изобретении, термин «амилоид- β -опосредованное заболевание» представляет собой расстройство, возникающее в результате внеклеточного накопления амилоида- β , что приводит к образованию амилоидных бляшек в ткани головного мозга. Примеры амилоид- β -опосредованных заболеваний включают болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и церебральную амилоидную ангиопатию (САА).

Как используется в настоящем изобретении, термин «тау-опосредованное заболевание» представляет собой нарушение, возникающее в результате агрегации тау-белка в нейрофибриллярные клубки. Клубки образуются в результате гиперфосфорилирования тау, в результате чего белок диссоциирует от микротрубочек и от агрегатов. Таупатии можно разделить на «первичные таупатии», при которых патология обусловлена прежде всего агрегацией тау-белка, и «вторичные таупатии», при которых болезнь вызывает другой фактор (например, амилоидные β -бляшки при болезни Альцгеймера) и наличие тауопатий усугубляет прогрессирование заболевания. Примеры первичных тауопатий включают лобно-височную деменцию (FTD) прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кордикобазальную дегенерацию (CBD), болезнь Пика (PiD), глобулярные глиальные таупатии (GGT), лобно-височную деменцию с паркинсонизмом (FTDP, FTDP-17), хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ), кулачную деменцию, аргирофильную зерновую болезнь (AGD) и первичную возрастную таупатию (PART). Примеры вторичных тауопатий включают AD, болезнь Крейтцфельда-Якоба, синдром Дауна и семейную британскую деменцию.

Полиморфизм APOE был связан с множественными таупатиями. Было обнаружено, что аллель APOE4 ускоряет нейродегенерацию и снижает возраст начала лобно-височной деменции (FTD) у пациентов с мутациями MAPT (Koriath, C. *et al.* (2019) *Alzheimers Dement* 11:277-280). Кроме того, наличие APOE4 коррелировало с более выраженной хронической травматической энцефалопатией (СТЕ) при вскрытии головного мозга футболистов с низким воздействием повторяющихся ударов головой (Verscaj, C. *et al.* (2017) *Neurology* 88 (16) Supplement S9.001) и в мозгу боксеров (Jordan, B.D. *et al.* (1997) *JAMA* 278(2): 136-140). Наличие аллеля APOE4 также связано с повышенным риском болезни Крейтцфельда-Якоба (CJD), в то время как присутствие аллеля APOE3 связано с защитой от предрасположенности к болезни Крейтцфельда-Якоба (CJD) (Wei, Y. *et al.* (2013) *J Clinical Neuroscience* 21(3): 390-394).

Кроме того, Shi *et al.* описали, что в мышинной модели FTD P301S, когда присутствовал APOE4, наблюдалось заметное повышение уровней тау, атрофия головного

мозга и нейровоспаление по сравнению с тем, когда присутствовали APOE2, APOE3 или нокаут APOE (Shi *et al.*, (2017) *Nature* 549: 523-527). В другом исследовании с использованием мышиной модели, которая экспрессирует человеческий тау с мутацией P301L, обнаруженной при FTD с паркинсонизмом, гиперфосфорилированным тау, агрегацией тау, поведенческие аномалии усугублялись на фоне APOE2 (Zhao, N. *et al.*, (2018) *Nat Commun* 9:4388). Zhao *et al.* далее идентифицировали связь между генотипом APOE $\epsilon 2/\epsilon 2$ с риском тауопатий в подтвержденных случаях прогрессирующего надъядерного паралича (PSP) и кортикобазальной дегенерации, предполагая, что APOE2 может быть защитным при наличии амилоидной патологии, APOE2 связан с повышенной тяжестью тау патологии при отсутствии амилоидной патологии.

«Болезнь Альцгеймера» («AD») представляет собой хроническое нейродегенеративное заболевание, которое обычно начинается медленно и постепенно ухудшается с течением времени. Наиболее распространенным ранним симптомом является затруднение припоминания недавних событий. По мере прогрессирования заболевания симптомы могут включать проблемы с речью, дезориентацию (в том числе легкое забвение), перепады настроения, потерю мотивации, неумение заботиться о себе и поведенческие проблемы. Когда состояние человека ухудшается, он часто уходит из семьи и общества. Постепенно функции организма утрачиваются, что в конечном итоге приводит к смерти.

Нейропатологически AD характеризуется потерей нейронов и синапсов в коре головного мозга и некоторых подкорковых областях. Эта потеря приводит к грубой атрофии пораженных областей, включая дегенерацию височной и теменной долей, а также частей лобной коры и поясной извилины. Дегенерация также присутствует в ядрах ствола мозга, таких как голубое пятно. Исследования с использованием MRI и PET зафиксировали уменьшение размера определенных областей мозга у людей с AD по мере того, как они прогрессировали от легких когнитивных нарушений до болезни Альцгеймера, и по сравнению с аналогичными изображениями здоровых пожилых людей.

И амилоидные бляшки, и нейрофибриллярные клубки хорошо видны при микроскопии в головном мозге больных AD. Бляшки представляют собой плотные, в основном нерастворимые отложения бета-амилоидного пептида и клеточного материала снаружи и вокруг нейронов. Клубки (нейрофибриллярные клубки) представляют собой агрегаты ассоциированного с микротрубочками тау-белка, который стал гиперфосфорилированным и накапливается внутри самих клеток. Хотя у многих пожилых людей в результате старения появляются бляшки и узелки, в мозгу людей с AD их больше в определенных областях мозга, таких как височная доля. Тельца Леви нередко встречаются в мозге людей с AD.

Национальный институт неврологических и коммуникативных расстройств и инсульта (NINCDS) и Ассоциация болезни Альцгеймера и родственных расстройств (ADRDA, теперь известная как Ассоциация Альцгеймера) установили наиболее часто используемые критерии Альцгеймера NINCDS-ADRDA для диагностики в 1984 г., которые

были значительно обновлены в 2007 г. Эти критерии требуют, чтобы наличие когнитивных нарушений и подозрение на синдром деменции подтверждалось нейропсихологическим тестированием для установления клинического диагноза возможной или вероятной болезни Альцгеймера. Для окончательного диагноза требуется гистопатологическое подтверждение, включая микроскопическое исследование ткани головного мозга. Между диагностическими критериями и окончательным гистопатологическим подтверждением была показана хорошая статистическая надежность и достоверность. Восемь интеллектуальных доменов чаще всего нарушаются при AD: память, речь, перцептивные навыки, внимание, двигательные навыки, ориентация, решение проблем и исполнительные функциональные способности. Эти домены эквивалентны критериям Альцгеймера NINCDS-ADRDA, перечисленным в Диагностическом и статистическом руководстве по психическим расстройствам (DSM-IV-TR), опубликованном Американской психиатрической ассоциацией.

В настоящее время препараты, доступные для лечения пациентов с AD, включают ингибиторы холинэстеразы и мемантин. Эти препараты могут улучшить качество жизни пациентов за счет лечения симптомов, связанных, например, с памятью, мышлением и речью, однако они не влияют на прогрессирование заболевания или скорость его снижения.

Причина AD плохо изучена, но, как обсуждалось выше, наличие APOE4 является основной детерминантой риска позднего начала болезни Альцгеймера (AD), симптомы которой развиваются после 65 лет, и многочисленные исследования на животных моделях амилоид- β -опосредованного заболевания (AD) и тау-опосредованного заболевания продемонстрировали, что ингибирование APOE, например, APOE4, оказывает благотворное влияние на образование амилоидных бляшек и когнитивные способности.

«Синдром Дауна» («DS»), также известный как трисомия 21, представляет собой генетический дефект, обусловленный наличием всей или части третьей копии хромосомы 21. DS представляет собой пожизненное состояние, связанное с умственной отсталостью, характерным внешним видом лица, слабым мышечным тонусом в младенчестве, и люди с DS часто испытывают постепенное снижение когнитивных способностей. Третья хромосома 21 несет ген дополнительного белка-предшественника амилоида (APP), а избыточная продукция амилоида приводит к накоплению бляшек амилоида- β и, следовательно, увеличивает риск ранней болезни Альцгеймера (AD) более чем на 50%. Другим геном, который трижды повторяется при DS, является DYRK1A, который влияет на альтернативный сплайсинг тау, приводя тау к аномальному гиперфосфорилированию и способствуя нейрофибриллярной дегенерации (Hartley D. *et al.* (2016) *Alzheimers Dement* 11(6): 700-709). У лиц с DS с атопическим дерматитом наблюдаются нейропатологические изменения, сходные с обычными пациентами с атопическим дерматитом, включая амилоидные бляшки, тау-нейрофибриллярные клубки, окислительное повреждение и потерю нейронов. Повышенные уровни как амилоида, так и тау обнаруживаются в спинномозговой жидкости больных DS (Lee, N.C. *et al.* (2017) *Neurology and Therapy* 6: 69-81).

«Церебральная амилоидная ангиопатия» («САА») представляет собой форму ангиопатии, при которой амилоидные бляшки откладываются в стенках мелких и средних кровеносных сосудов и в определенных областях головного мозга. Амилоидные бляшки повреждают клетки головного мозга и нарушают работу различных отделов головного мозга. Кроме того, отложения амилоида в кровеносных сосудах замещают мышечные и эластичные волокна, которые придают кровеносным сосудам гибкость, в результате чего они становятся склонными к разрыву. САА может привести к деменции, внутричерепному кровоизлиянию и транзиторным неврологическим расстройствам. САА был признан одним из морфологических признаков болезни Альцгеймера. Мутации в гене белка-предшественника амилоида- β (APP) являются наиболее распространенной причиной наследственной САА (Desimone C.V. *et al.* (2017) *J Am Coll Cardiol* 70(9): 1173-1182).

«Лобно-височная деменция» («FTD»), которая включает в себя такие заболевания, как болезнь Пика, прогрессирующий надъядерный паралич (PSP) и кортикобазальный денегарион (CBD). FTD является распространенным типом деменции у пациентов моложе 65 лет и включает в себя группу нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся прогрессирующим ухудшением поведения, исполнительных функций или речи. При FTD утрачиваются нервные клетки в лобных и височных долях головного мозга, поэтому FTD также называют лобно-височной долевой дегенерацией (FTLD). Мутации в гене тау-белка, ассоциированного с микротрубочками (MAPT), и накопление тау-белка обнаруживаются при нескольких подтипах ЛВД, включая болезнь Пика, прогрессирующий надъядерный паралич (PSP) и кортикобазальную дегенерацию (CBD).

«Болезнь Пика» характеризуется поразительной нежевидной атрофией лобной, височной и поясной извилин, где лучше сохраняется теменная доля.

«Кортикобазальная дегенерация» («CBD») характеризуется преимущественной потерей клеток в дорсальной префронтальной коре, дополнительной двигательной области, перироландической коре и подкорковых ядрах.

«Прогрессирующий надъядерный паралич» («PSP») связан с атрофией лобной выпуклости; подкорковая атрофия является тяжелой на уровне бледного шара, субталамического ядра и ядер ствола мозга (Olney, N.T. *et al.* (2017) *Neurol Clin* 35(2): 339-374).

«Глобулярные глиальные тауопатии» («GGT») представляют собой тип редкой лобно-височной долевой дегенерации (FLD), при которой широко распространены глобулярные включения в астроцитах и олигодендроцитах, содержащих изоформу тау с 4 повторами. Эти случаи связаны с рядом клинических проявлений, которые коррелируют с тяжестью и распространением лежащей в основе тау-патологии и нейродегенерации (Ahmed, Z. *et al.* (2013) *Acta Neuropathol* 126(4): 537-544).

«Лобно-височная деменция с паркинсонизмом» («FTDP») представляет собой менее распространенный тип FTD, который также влияет на двигательную активность. Было обнаружено, что хромосома 17 связана с FTDP (FTDP-17), а мутации тау-белка, ассоциированного с микротрубочками (MAPT) на хромосоме 17, были обнаружены во

многих родственных связях с семейной FTDP-17. FTDP-17 из-за мутаций в MAPP начинается в возрасте 25-65 лет, а пенетрантность близка к 100%. Симптомы включают исполнительную дисфункцию и измененную личность и поведение с афазией и паркинсонизмом, развивающимися у многих людей (Boeve, B.F. *et al.* (2008) *Arch Neurol* 65(4): 460-464).

«Хроническая травматическая энцефалопатия» («СТЕ») представляет собой изнурительное нейродегенеративное заболевание, возникающее в результате повторяющихся легких черепно-мозговых травм, обнаруживаемое у многих спортсменов, особенно у футболистов. Нейропатологический признак СТЕ включает накопление фосфорилированного тау в бороздах и периваскулярных областях, микроглиоз и астроцитоз; из некоторых отложений тау на ранней стадии заболевание может прогрессировать до глобальной атрофии головного мозга на поздней стадии. СТЕ может прогрессировать в течение многих лет от легких симптомов, таких как дефицит кратковременной памяти и легкая агрессия, до выраженного дефицита речи и психотических симптомов, включая паранойю и паркинсонизм (Fesharaki-Zadeh, A.(2019) *Front Neurol* 10:713).

«Боксерское слабоумие» представляет собой форму СТЕ, которая включает выраженное нарушение когнитивных и двигательных функций из-за повторяющихся ударов по голове во время занятий боксом (Castellani. R.J *et al.* (2017) *J Alzheimers Dis* 60(4): 1209-1221).

«Аргирофильная зерновая болезнь» («AGD») в нескольких исследованиях представляет собой очень частую спорадическую таупатию и второе по распространенности нейродегенеративное заболевание после болезни Альцгеймера. AGD представляет собой нейродегенеративное заболевание с поздним началом, характеризующееся небольшими веретенообразными или запятовидными положительными пятнами серебра в отростках нейронов, называемыми аргирофильными зернами (AG). Фосфорилированный тау является основным компонентом AG. Наиболее частым проявлением AGD являются медленно прогрессирующие, амнестические и легкие когнитивные нарушения, сопровождающиеся высокой распространенностью психоневрологических симптомов. Из-за отсутствия выраженных клинических признаков AGD часто диагностируется только посмертно на основании трех патологических признаков: AG, олигодендроцитарных спиральных телец и нейронных клубков (Rodriguez, R.D. *et al.*(2015) *Dement Neuropsychol* 9(1): 2-8).

«Первичная возрастная таупатия» («PART») представляет собой патологию, обычно наблюдаемую посмертно в головном мозге пожилых людей, чьи когнитивные функции нормальны или лишь слегка нарушены. Мозг PART имеет тау-нейрофибриллярные клубки, неотличимые от таковых при болезни Альцгеймера, но не имеет бляшек β -амилоида (Crary, J.F. *et al.* (2014) *Acta Neuropathol* 128(6): 755-66).

«Болезнь Кройцфельда-Якоба» («CJD») принадлежит к семейству заболеваний человека и животных, известных как трансмиссивные губчатые энцефалопатии (TSE) или

прионные заболевания. Прион, происходящий от слов «белок» и «инфекционный», вызывает CJD у людей и TSE у животных. Губчатая форма относится к характерному внешнему виду инфицированного мозга, который заполняется отверстиями, пока не станет напоминать губку при исследовании под микроскопом. CJD представляет собой редкое, дегенеративное и фатальное заболевание головного мозга, которое обычно появляется в более позднем возрасте и протекает быстро. Типичное появление симптомов происходит примерно в возрасте 60 лет, и около 70 процентов людей умирают в течение одного года. На ранних стадиях заболевания у людей могут быть проблемы с памятью, изменениями в поведении, нарушением координации и нарушениями зрения. По мере прогрессирования болезни ухудшение психики становится выраженным, возможны непроизвольные движения, слепота, слабость конечностей, кома. В дополнение к прионным бляшкам тау-патология также наблюдается в нескольких областях мозга пациентов с CJD, и спинномозговая жидкость пациентов с широко распространенной таупатологией также имеет повышенный уровень общего тау-белка (Kovacs, G.G *et al.* (2017) *Brain Pathol* 3: 332-344).

«Семейная британская деменция» («FBD») представляет собой тип церебральной амилоидной ангиопатии, которая была впервые задокументирована у больных членов большой британской родословной с клиническими проявлениями, включая деменцию, спастический тетрепарез и мозжечковую атаксию. FBD вызывается мутацией в гене BRI2. Амилоидные бляшки при FBD состоят из амилоида-Bri, а тау-положительные нейрофибриллярные клубки обнаруживаются в областях, пораженных амилоид-Bri поражениями. Иммуноблотинг тау-белка при FBD подобен образцам тау-белка при болезни Альцгеймера (Holton J.L. *et al.* (2001) *Am J Patho* 2: 515-526).

"Терапевтически эффективное количество," как используется в настоящем изобретении, включает количество агента RNAi, которое при введении субъекту, имеющему АРОЕ-ассоциированное нейродегенеративное заболевание, является достаточным для осуществления лечения заболевания (например, путем уменьшения, смягчения или поддержания существующего заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания). «Терапевтически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от агента RNAi, того, каким образом средство вводят, заболевания и его тяжести и анамнеза, возраста, массы тела, семейного анамнеза, генетического фона, типов предшествующих и сопутствующих терапий при их наличии и других индивидуальных характеристик субъекта, которого лечат.

«Профилактически эффективное количество», как используется в настоящем изобретении, включает количество агента RNAi, которое при введении субъекту, имеющему АРОЕ-ассоциированное нейродегенеративное заболевание, является достаточным для профилактики или смягчения заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания. Смягчение заболевания включает замедление течения заболевания или снижение тяжести заболевания, которое разовьется позднее. «Профилактически эффективное количество» может варьировать в зависимости от агента RNAi, того, каким

образом средство вводят, заболевания и его тяжести и анамнеза, возраста, массы тела, семейного анамнеза, генетического фона, типов предшествующих и сопутствующих терапий при их наличии и других индивидуальных характеристик субъекта, которого лечат.

«Терапевтически эффективное количество» или «профилактически эффективное количество» также включает количество агента RNAi, которое обеспечивает некоторый желаемый локальный или системный эффект при приемлемом соотношении польза/риск, подходящем для любого способа лечения. Агент RNAi, используемый в способах по настоящему изобретению, можно вводить в достаточном количестве для обеспечения приемлемого соотношения польза/риск, подходящего для такого лечения.

Выражение «фармацевтически приемлемый» используют в настоящем документе для обозначения соединений, веществ, композиций и/или дозированных форм, которые по мнению медицинского практикующего специалиста, являются пригодными для применения в контакте с тканями человека и животного без избыточной токсичности, раздражения, аллергического ответа или другой проблемы или осложнения, в соответствии с приемлемым соотношением польза/риск.

Выражение «фармацевтически приемлемый носитель», как используется в настоящем изобретении, означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент, производственную добавку (например, смазывающее вещество, тальк, стеарат магния, кальция или цинка или стеариновая кислота), или растворимый инкапсулирующий материал, вовлеченный в перенос или транспорт рассматриваемого соединения из одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Каждый носитель должен быть «приемлемым» с точки зрения совместимости с другими ингредиентами состава и не вредоносным для индивидуума, подвергаемого лечению. Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлоза и ее производные, такие как натрий карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошковый трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) смазывающие вещества, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк; (8) эксципиенты, такие как масло какао и воски для суппозиторий; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) не содержащую пирогенов воду; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) pH-буференные растворы; (21) полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; (22) увеличивающие объем средства, такие как полипептиды и аминокислоты (23) компонент сыворотки, такой как сывороточный альбумин, HDL и LDL;

и (22) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

Термин «образец», как используется в настоящем изобретении, включает коллекцию сходных жидкостей, клеток или тканей, взятых от индивидуума, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих у индивидуума. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку и серозную жидкость, плазму, цереброспинальную жидкость, глазную жидкость, лимфу, мочу, слюну и тому подобное. Образцы тканей могут включать образцы из тканей, органов или локализованных областей. Например, образцы могут происходить из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток в этих органах. Например, образцы могут происходить из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток в этих органах. В некоторых вариантах осуществления изобретения образцы могут быть получены из головного мозга (например, всего головного мозга или определенных сегментов головного мозга, например полосатого тела, или определенных типов клеток головного мозга, таких как, например, нейроны и глиальные клетки (астроциты, олигодендроциты, микроглиальные клетки)). В других вариантах осуществления изобретения «образец, полученный от субъекта», относится к ткани печени (или ее субкомпонентам), полученной от субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения «образец, полученный от субъекта», относится к крови, взятой у субъекта, или плазме или сыворотке, полученной из него. В дополнительных вариантах осуществления изобретения «образец, полученный от субъекта», относится к ткани головного мозга (или ее субкомпонентам) или ткани сетчатки (или ее субкомпонентам), полученной от субъекта.

II. Агенты RNAi по изобретению

В настоящем документе описаны агенты RNAi, которые ингибируют экспрессию гена APOE. В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты RNAi, представленные в настоящем документе, ингибируют экспрессию аллеля APOE2, аллеля APOE3 и аллеля APOE4. В других вариантах осуществления изобретения агенты RNAi, представленные в настоящем документе, ингибируют экспрессию аллеля APOE4, например, агенты RNAi практически не ингибируют экспрессию аллеля APOE2 или аллеля APOE3, например, ингибирование экспрессии APOE2 и/или APOE3 не является более около 10%. В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi включает молекулы двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии гена APOE в клетке, такой как клетка субъекта, например, млекопитающего, такого как человек, имеющего APOE-ассоциированное нейродегенеративное заболевание, например, амилоид- β -опосредованное заболевание, такое как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и церебральная амилоидная ангиопатия, и тау-опосредованные заболевания, например, первичная таупатия, такая как лобно-височная деменция (FTD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кордикобазальная дегенерация (CBD), болезнь Пика (PiD), глобулярные глиальные таупатии (GGT), лобно-височная деменция с паркинсонизмом (FTDP, FTDP-17), хроническая травматическая энцефалопатия (CTE), кулачная деменция, лобно-височная долевая дегенерация (FTLD), аргирофильная зерновая болезнь (AGD) и

первичная возрастная таупатия (PART) или вторичная таупатия, например, AD, болезнь Крейтцфельда-Якоба, синдром Дауна и семейная британская деменция. dsRNA включает антисмысловую цепь, имеющую область комплементарности, которая комплементарна по меньшей мере части mRNA, образованной при экспрессии гена APOE. Участок комплементарности имеет длину около 15-30 нуклеотидов или менее. При контакте с клеткой, экспрессирующей ген APOE, агент RNAi ингибирует экспрессию гена APOE (например, гена человека, гена примата, гена, не принадлежащего примату) по меньшей мере на 50%, как определено, например, с помощью PCR или способом на основе разветвленной DNA (b-DNA), или способом на основе белка, таким как иммунофлуоресцентный анализ, с использованием, например, вестерн-блоттинга или способов проточной цитометрии. В одном варианте осуществления изобретения уровень нокдауна анализируют при концентрации siRNA 10 нМ в клетках нейробластомы человека BE(2)-C с использованием метода анализа двойной люциферазы, представленного в примере 1 ниже.

dsRNA включает две цепи RNA, которые являются комплементарными и гибридизуются с образованием дуплексной структуры в условиях, в которых будет использована dsRNA. Одна цепь dsRNA (антисмысловая цепь) включает участок комплементарности, которая по существу комплементарна, и, как правило, полностью комплементарна, последовательности-мишени. Последовательность-мишень может происходить из последовательности mRNA, образовавшейся во время экспрессии гена APOE. Другая цепь (смысловая цепь) включает область, которая комплементарна антисмысловой цепи, так что две цепи гибридизуются и образуют дуплексную структуру, когда их комбинируют в подходящих условиях. Как описано в настоящем описании и как известно в данной области, комплементарные последовательности dsRNA также могут содержаться в качестве самокомплементарных областей одной молекулы нуклеиновой кислоты, в противоположность отдельным олигонуклеотидам.

Как правило, дуплексная структура имеет длину от 15 до 30 пар оснований, например, длину в 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пар оснований. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения структура дуплекса имеет длину от 18 до 25 пар оснований, например, длину в 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-25, 21-24, 21-23, 21-22, 22-25, 22-24, 22-23, 23-25, 23-24 или 24-25 пар оснований, например, 19-21 пар оснований. Также предусматривается, что диапазоны и длины, являющиеся промежуточными для указанных выше диапазонов и длин, являются частью изобретения.

Подобным образом, участок комплементарности целевой последовательности имеет длину от 15 до 30 пар оснований, например, длину в 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-

24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотидов в длину, например, 19-23 нуклеотидов или 21-23 нуклеотидов. Также предусматривается, что диапазоны и длины, являющиеся промежуточными для указанных выше диапазонов и длин, являются частью изобретения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения dsRNA имеет длину от 15 до 23 нуклеотида или от 25 до 30 нуклеотидов. Обычно dsRNA является достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для фермента Dicer. Например, в данной области хорошо известно, что dsRNA длиной более чем около 21-23 нуклеотида могут служить в качестве субстратов для Dicer. Как также будет понятно специалисту в данной области, область RNA, нацеленная на расщепление, наиболее часто является частью более крупной молекулы RNA, часто молекулы mRNA. Когда это приемлемо, «часть» mRNA-мишени представляет собой непрерывную последовательность mRNA-мишени достаточной длины, чтобы позволить ей быть субстратом для RNAi-направленного расщепления (то есть расщепление через каскад RISC).

Специалисту в данной области также будет понятно, что участок дуплекса представляет собой основной функциональной частью dsRNA, например, дуплексная область из около от 15 до 36 пар оснований, например, 15-36, 15-35, 15-34, 15-33, 15-32, 15-31, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пар оснований, например, 19-21 пар оснований. Таким образом, в одном варианте осуществления, в той мере, в какой он становится переработанным в функциональный дуплекс, например, из 15-30 пар оснований, который нацелен на желаемую RNA для расщепления, молекула RNA или комплекс молекул RNA, имеющий дуплексный участок более 30 пар оснований, представляет собой dsRNA. Таким образом, обычному специалисту в данной области будет понятно, что в одном варианте осуществления изобретения miRNA представляет собой dsRNA. В другом варианте осуществления изобретения dsRNA не является встречающейся в природе miRNA. В другом варианте осуществления изобретения агент RNAi, пригодный для нацеливания на экспрессию APOE, не образуется в клетке-мишени путем расщепления более крупной dsRNA.

dsRNA, как описано в настоящем документе, может дополнительно включать один или несколько одноцепочечных нуклеотидный выступов, например, 1, 2, 3 или 4 нуклеотида. Нуклеотидный выступ может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Выступ(ы) может быть на смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того,

нуклеотид(ы) выступа могут находиться на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах либо антисмысловой, либо смысловой цепи dsRNA.

dsRNA можно синтезировать стандартными способами, известными в данной области.

В одном аспекте dsRNA по изобретению включает по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность. Последовательность смысловой цепи для APOE может быть выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из таблиц 2-5 и 7-10, а соответствующая нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи смысловой цепи может быть выбрана из группы последовательностей, представленной в любой из таблиц 2-5 и 7-10. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, при этом одна из последовательностей в значительной степени комплементарна последовательности mRNA, генерируемой при экспрессии гена APOE. Таким образом, в этом аспекте dsRNA будет включать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описан как смысловая цепь (пассажирская цепь) в любой из таблиц 2-5 и 7-10, а второй олигонуклеотид описан как соответствующая антисмысловая цепь (направляющая цепь) смысловой цепи в любой из таблиц 2-5 и 7-10 для APOE.

В одном варианте осуществления изобретения по существу комплементарные последовательности dsRNA содержатся в отдельных олигонуклеотидах. В другом варианте осуществления изобретения по существу комплементарные последовательности dsRNA содержатся в одном олигонуклеотиде.

Следует понимать, что, хотя последовательности в таблицах 3, 5, 8 и 10 описаны как модифицированные или конъюгированные последовательности, а последовательности в таблицах 2, 4, 7 и 9 описаны как немодифицированные, RNA агента RNAi по изобретению например, dsRNA по изобретению, может содержать любую из последовательностей, указанных в любой из таблиц 2-5 и 7-10, которая является немодифицированной, неконъюгированной или модифицированной или конъюгированной иначе, чем описано в нем. Один или несколько липофильных лигандов и/или один или несколько лигандов GalNAc могут быть включены в любое из положений агентов RNAi, предложенных в настоящей заявке.

Специалисту в данной области техники хорошо известно, что dsRNA, имеющие дуплексную структуру примерно из 20-23 пар оснований, например, 21 пару оснований, признаны особенно эффективными в индукции RNA-интерференции (Elbashir *et al.*, (2001) *EMBO J.*, 20:6877-6888). Однако другие исследователи обнаружили, что более короткие или более длинные дуплексные структуры RNA также могут быть эффективными (Chu и Rana (2007) *RNA* 14:1714-1719; Kim *et al.* (2005) *Nat Biotech* 23:222-226). В вариантах осуществления, описанных выше, в силу природы олигонуклеотидных последовательностей, представленных в настоящем документе, dsRNA, описанные в настоящем документе, могут включать по меньшей мере одну цепь длиной не менее 21 нуклеотида. Можно разумно ожидать, что более короткие дуплексы, за исключением

нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, могут быть столь же эффективны по сравнению с описанными выше dsRNA. Следовательно, предполагается, что в пределах объема настоящего изобретения входят dsRNA, имеющие последовательность из по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более последовательных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей, представленных в настоящем документе, и отличающиеся по своей способности ингибировать экспрессию гена APOE не более чем на 10, 15, 20, 25 или 30% ингибирования от dsRNA, содержащей полную последовательность, с использованием анализа *in vitro* с Cos7 и концентрацией RNA-агента 10 нМ и анализа PCR, как представлено в приведенных в настоящем документе примерах.

Кроме того, RNA, описанные в настоящем документе, идентифицируют сайт(ы) в транскрипте APOE, который чувствителен к RISC-опосредованному расщеплению. Таким образом, в настоящем изобретении дополнительно представлены агенты RNAi, нацеленные на этот сайт(ы). Как используется в настоящем документе, говорят, что агент RNAi нацеливается на конкретный сайт транскрипта RNA, если агент RNAi способствует расщеплению транскрипта в любом месте этого конкретного сайта. Такой агент RNAi обычно включает по меньшей мере около 15 последовательных нуклеотидов, предпочтительно, по меньшей мере 19 нуклеотидов из одной из представленных в настоящем документе последовательностей, соединенных с дополнительными последовательностями нуклеотидов, взятыми из области, прилегающей к выбранной последовательности в гене APOE.

Агент RNAi, описанный в настоящем документе, может содержать одно или несколько ошибочных спариваний с последовательностью-мишенью. В одном варианте осуществления агент RNAi, описанный в настоящем документе, содержит не более 2-3 ошибочных спариваний (то есть 3, 2, 1 или 0 ошибочных спариваний). В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi, описанный в настоящем документе, содержит не более 2 ошибочных спариваний. В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi, описанный в настоящем документе, содержит не более 1 ошибочного спаривания. В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi, описанный в настоящем документе, содержит 0 ошибочных спариваний. В некоторых вариантах осуществления изобретения, если антисмысловая цепь агента RNAi содержит ошибочные спаривания с последовательностью-мишенью, это ошибочное спаривание может быть необязательно ограничено последними 5 нуклеотидами либо с 5'-, либо с 3'-конца области комплементарности. Например, в таких вариантах осуществления для агента RNAi из 23 нуклеотидов цепь, комплементарная области гена APOE, обычно не содержит каких-либо ошибочных спариваний в пределах центральных 13 нуклеотидов. Способы, описанные в настоящем документе, или способы, известные в данной области, можно использовать для определения того, является ли агент RNAi, содержащий несовпадение с последовательностью-мишенью, эффективным для ингибирования экспрессии гена APOE. Рассмотрение эффективности агентов RNAi с ошибочными спариваниями в ингибировании экспрессии гена APOE важно, особенно если известно, что конкретная область

комплементарности в гене APOE имеет полиморфные вариации последовательности в пределах популяции.

III. Модифицированные агенты RNAi по изобретению

В одном варианте осуществления изобретения RNA агента RNAi по изобретению, например, dsRNA, является немодифицированной и не содержит, например, химических модификаций и/или конъюгаций, известных в данной области и описанных в настоящем описании. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения RNA агента RNAi по изобретению, например, dsRNA, является химически модифицированной для повышения стабильности или других благоприятных характеристик. В некоторых вариантах осуществления изобретения по изобретению, практически все нуклеотиды агента RNAi по изобретению являются модифицированными. В других вариантах осуществления изобретения все нуклеотиды агента RNAi по изобретению модифицированы. Агенты RNAi по изобретению, в которых «по существу все нуклеотиды модифицированы», в значительной степени, но не полностью модифицированы, и могут включать не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированных нуклеотидов. В других вариантах осуществления настоящего изобретения агенты RNAi согласно настоящему изобретению могут включать не более 5, 4, 3, 2 или 1 модифицированного нуклеотида.

Нуклеиновые кислоты, представленные в описании, могут быть синтезированы или модифицированы способами, хорошо известными в данной области, такими как описанные в работе «Current protocols in nucleic acid chemistry», Beaucage, S.L. *et al.* (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, которая настоящим включена в настоящее описание в качестве ссылки. Модификации включают, например, модификации концов, например, модификации 5'-конца (фосфорилирование, конъюгация, инвертированные связи) или модификации 3'-конца (конъюгация, нуклеотиды DNA, инвертированные связи и т.д.); модификации оснований, например, замена стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые образуют пары с расширенным репертуаром партнеров, удаление оснований (нуклеотидов с основанием) или конъюгированных оснований; модификации сахара (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замену сахара, или модификации скелета, включая модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры агентов RNAi, применимых в вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, RNA, содержащие модифицированные скелеты или не содержащие природных межнуклеозидных связей. RNA с модифицированным остовом включают, среди прочего, те, которые не имеют атома фосфора в остове. Для целей настоящего описания и как иногда упоминается в данной области техники, модифицированные RNA, которые не имеют атома фосфора в их межнуклеозидном остове, также могут считаться олигонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный агент RNAi будет иметь атом фосфора в своем межнуклеозидном остове.

Структуры модифицированных RNA включают, например, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоксилфосфотриэфиры, метил и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидат и аминоксилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, имеющие нормальные связи 3'-5', их аналоги, связанные 2'-5', и те, которые имеют обратную полярность, в которых соседние пары нуклеозидных блоков связаны с 3'-5' к 5'-3' или от 2'-5' до 5'-2'. Также включены различные соли, например, соли натрия, смешанные соли и формы свободной кислоты.

Репрезентативные патенты США, в которых описано получение вышеуказанных фосфорсодержащих соединений, включают, но не ограничиваются ими, патенты США №№ 3687808, 4469863, 4476301, 5023243, 5177195, 5188897, 5264423, 5276019, 5278302, 5286717, 5321131, 5399676, 5405939, 5453496, 5455233, 5466677, 5476925, 5519126, 5536821, 5541316, 5550111, 5563253, 5571799, 5587361, 5625050, 6028188, 6124445, 6160109, 6169170, 6172209, 6239265, 6277603, 6326199, 6346614, 6444423, 6531590, 6534639, 6608035, 6683167, 6858715, 6867294, 6878805, 7015315, 7041816, 7273933, 7321029 и RE39464, полное содержание каждого из указанных включено в настоящее описание посредством ссылки.

Структуры модифицированных RNA, которые не включают атом фосфора, имеют структуры, образованные короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомами и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями или одной или несколькими короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. К ним относятся те, которые имеют морфолиновые связи (частично образованные из сахарной части нуклеозида); силоксановые структуры; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые структуры; ацетильные и тиоацетильные структуры; метиленацетильные и тиоацетильные структуры; алкенсодержащие структуры; сульфаматные структуры; метиленимино- и метиленигидразино- структуры; сульфонатные и сульфаниламидные структуры; амидные структуры и другие, содержащие смешанные компоненты N, O, S и CH₂.

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

В других вариантах осуществления изобретения предполагаются подходящие миметики RNA для использования в агентах RNAi, в которых как сахар, так и межнуклеозидная связь, то есть структура, нуклеотидных единиц заменены новыми

группами. Элементы оснований сохраняют для гибридизации с соответствующим целевым соединением нуклеиновой кислоты. Одно такое олигомерное соединение, миметик RNA, которое, как было показано, обладает превосходными свойствами гибридизации, называется пептидной нуклеиновой кислотой (PNA). В соединениях PNA структура сахара RNA заменяется структурой, содержащим амид, в частности, структурой аминоксипролина. Нуклеиновые основания сохраняются и связаны прямо или косвенно с атомами азота азатрупа амидной части структуры. Репрезентативные патенты США, в которых описано получение соединений PNA, включают, но не ограничиваются ими, патенты США №№ 5539082, 5714331 и 5719262, полное содержание каждого из указанных включено в настоящее описание посредством ссылки. Дополнительные соединения PNA, пригодные для применения в агентах RNAi по изобретению, описаны, например, Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления изобретения включают RNA с фосфоротиоатными структурами и олигонуклеозиды со структурами, содержащими гетероатомы, и, в частности, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ [известный как структура метилен(метилямино) или MMI], $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ и $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, описанные в вышеуказанном патенте США № 5489677, и амидными структурами, описанные в вышеуказанном патенте США № 5602240. В некоторых вариантах осуществления изобретения RNA, описанные в настоящем документе, имеют структуры морфолина, описанные выше в патенте США № 5034506. Нативная фосфодиэфирная структура может быть представлена как $\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-\text{OCH}_2-$.

Модифицированные RNA также могут содержать одну или несколько фрагментов замещенного сахара. Агенты RNAi, например, dsRNA, представленные в данном документе, во 2'-положении могут включать один из следующих: OH; F; O-, S-, или N-алкил; O-, S-, или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил; или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут представлять собой замещенный или незамещенный C_1-C_{10} алкил или C_2-C_{10} алкенил и алкинил. Примеры подходящих модификаций включают $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$, и $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, где n и m обозначают от 1 до около 10. В других вариантах осуществления изобретения dsRNA во 2'-положении включают один из следующих: C_1-C_{10} низший алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH_3 , OCN, Cl, Br, CN, CF_3 , OCF_3 , SOCH_3 , SO_2CH_3 , ONO_2 , NO_2 , N_3 , NH_2 , гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминоксипролинамино, полиалкиламино, замещенный силлил, расщепляющую RNA группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств агента RNAi или группу для улучшения фармакодинамических свойств агента RNAi и другие заместители, обладающие аналогичными свойствами. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, известный также как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-MOE) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504) то есть алкокси-алкокси группу. Другой типичной модификацией является 2'-диметиламинооксиэтокси, то

есть группа $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, известная также как 2'-DMAOE, описанная в приведенных ниже примерах, и 2'-диметиламиноэтоксигруппы (также известный в данной области техники как 2'-O-диметиламиноэтил или 2'-DMAEOE), то есть 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂. Дополнительные примеры модификаций включают: 5'-Me-2'-F-нуклеотиды, 5'-Me-2'-OMe-нуклеотиды, 5'-Me-2'-деоксинуклеотиды, (оба R- и S-изомеры в этих трех семействах); 2'-алкоксиалкил и 2'-NMA (N-метилацетамид).

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH₃), 2'-аминопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2'-*O*-гексадецил, и 2'-фтор (2'-F). Подобные модификации также могут быть сделаны в других положениях RNA агента RNAi, в частности, в 3'-положении сахара на 3'-концевом нуклеотиде или в 2'-5'-связанных dsRNA и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. Агенты RNAi также могут иметь миметики сахара, такие как циклобутильные группы, вместо пентофуранозилового сахара. Репрезентативные патенты США, в которых описывается получение таких структур модифицированного сахара, включают, но не ограничиваются ими, патенты США №№ 4981957, 5118800, 5319080, 5359044, 5393878, 5446137, 5466786, 5514785, 5519134, 5567811, 5576427, 5591722, 5597909, 5610300, 5627053, 5639873, 5646265, 5658873, 5670633 и 5700920, некоторые из которых принадлежат тому же заявителю, что и настоящая заявка. Полное содержание каждого из вышеперечисленных включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Агент RNAi по изобретению также может включать модификации или замены нуклеотидных оснований (часто называемых в данной области просто «основаниями»). Используемый в настоящем документе термин «немодифицированные» или «природные» нуклеосаиды включает пуриновые основания аденин (А) и гуанин (G) и пиримидиновые основания тимин (Т), цитозин (С) и урацил (U). Модифицированные азотистые основания включают другие синтетические и природные нуклеотидные основания, такие как 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропильные и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галоурацил и цитозин, 5-пропинилурацил и цитозин, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген, в частности 5-бром, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-деазааденин и 3-деазагуанин и 3-деазааденин. Следующие нуклеотидные основания включают основания, описанные в патенте США № 3687808, основания, описанные в работе Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; основания, описанные в работе The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, основания, описанные в Englisch *et al.*, (1991) *Angewandte Chemie, International Edition*, 30:613, основания, описанные Sanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из этих нуклеотидных оснований являются особенно

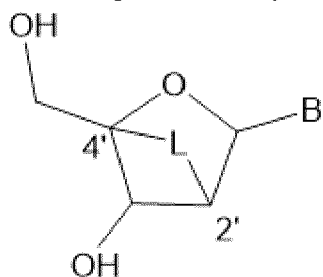
пригодными для повышения аффинности связывания олигомерных соединений по изобретению. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6-замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что замены на 5-метилцитозин повышают стабильность дуплекса нуклеиновых кислот на 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., *dsRNA Research и Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) и они являются примерами замен оснований, еще более конкретно, когда они комбинированы с модификациями сахаров 2'-О-метоксиэтилом.

Репрезентативные патенты США, в которых описано получение некоторых из описанных выше модифицированных нуклеотидных оснований, а также других модифицированных нуклеотидных оснований, включают, но не ограничиваются ими, описанные выше патенты США №№ 3687808 4845205, 5130302, 5134066, 5175273, 5367066, 5432272, 5457187, 5459255, 5484908, 5502177, 5525711, 5552540, 5587469, 5594121, 5596091, 5614617, 5681941, 5750692, 6015886, 6147200, 6166197, 6222025, 6235887, 6380368, 6528640, 6639062, 6617438, 7045610, 7427672 и 7495088, полное содержание каждого из указанных включено в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент RNAi по изобретению также могут быть модифицированы включением одной или нескольких фрагментов бициклического сахара. «Бициклический сахар» представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное кольцом, образованным мостиковым соединением двух атомов углерода, смежных или несмежных. «Бициклический нуклеозид» («BNA») представляет собой нуклеозид, имеющий сахарный фрагмент, содержащий кольцо, образованное мостиковым соединением двух атомов углерода, смежных или несмежных, сахарного кольца, образуя таким образом бициклическую кольцевую систему. В некоторых вариантах осуществления изобретения мостик соединяет 4'-углерод и 2'-углерод сахарного кольца, необязательно, через 2'-ациклический атом кислорода. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления агент по изобретению может включать одну или несколько закрытых нуклеиновых кислот (LNA). Заблокированная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, имеющий модифицированный фрагмент рибозы, в котором фрагмент рибозы содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-атомы углерода. Другими словами, LNA представляет собой нуклеотид, содержащий фрагмент бициклического сахара, содержащий мостик 4'-CH₂-O-2'. Эта структура эффективно «запирает» рибозу в 3'-эндо структурной конформации. Было показано, что добавление заблокированных нуклеиновых кислот к siRNA повышает стабильность siRNA в сыворотке и снижает побочные эффекты (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). Примеры бициклических нуклеозидов для применения в полинуклеотидах по изобретению включают без ограничения нуклеозиды, содержащие мостик между 4'- и 2'-атомами рибозильного кольца. В некоторых вариантах

осуществления изобретения антисмысловые полинуклеотидные агенты по изобретению включают один или несколько бициклических нуклеозидов, содержащих мостик с 4' на 2'.

Заблокированный нуклеозид может быть представлен структурой (без стереохимии),



где В представляет собой азотистое основание или модифицированное азотистое основание, а L представляет собой связующую группу, которая соединяет 2'-углерод с 4'-углеродом рибозного кольца. Примеры таких бициклических нуклеозидов, соединенных мостиком с 4' по 2', включают, но не ограничиваются ими, 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (также обозначаемый как «конформационно затрудненный этилом» или «сEt») и 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (и их аналоги; смотри, например, патент США № 7399845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (и их аналоги; смотри, например, патент США № 8278283); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (и их аналоги; смотри, например, патент США № 8278425); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (смотри, например, публикацию патента США № 2004/0171570); 4'-CH₂-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C₁-C₁₂ алкил, или защитную группу азота (смотри, например, патент США № 7427672); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (смотри, например, Chattopadhyaya *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); и 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (и их аналоги; смотри, например, патент США № 8278426). Полное содержание каждого из вышеперечисленных включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Дополнительные репрезентативные патенты США и публикации патентов США, в которых рассказывается о получении закрытых нуклеотидов нуклеиновых кислот, включают, но не ограничиваются ими, следующие: патенты США №№ 6268490, 6525191, 6670461, 6770748, 6794499, 6998484, 7053207, 7034133, 7084125, 7399845, 7427672, 7569686, 7741457, 8022193, 8030467, 8278425, 8278426, 8278283, US 2008/0039618 и US 2009/0012281, полное содержание каждого из указанных включено в настоящее описание посредством ссылки.

Любой из указанных выше бициклических нуклеозидов может быть получен с одной или несколькими стереохимическими конфигурациями сахаров, включая, например, α-L-рибофуранозу и β-D-рибофуранозу (см. WO 99/14226).

Агент RNAi по изобретению также может быть модифицирован для включения одного или нескольких конформационно затрудненных этилом нуклеотидов. Как используется в настоящем изобретении, «конформационно затрудненный этилом нуклеотид» или «сEt» представляет собой «закрытую» нуклеиновую кислоту, содержащую фрагмент бициклического сахара, включающий мостик 4'-CH(CH₃)-O-2'. В одном варианте осуществления изобретения конформационно затрудненный этилом нуклеотид имеет S-конформацию, именуемую в настоящем документе «S-cEt».

Агент RNAi по изобретению может также включать один или несколько «конформационно ограниченных нуклеотидов» («CRN»). CRN представляют собой аналоги нуклеотидов с линкером, соединяющим атомы углерода C2' и C4' рибозы или атомы углерода C3 и -C5' рибозы. CRN фиксирует кольцо рибозы в стабильной конформации и увеличивает аффинность гибридизации mRNA. Линкер имеет достаточную длину, чтобы поместить кислород в оптимальное положение для стабильности и аффинности, что приводит к меньшему сморщиванию кольца рибозы.

Репрезентативные публикации, в которых рассказывается о получении некоторых из указанных выше CRN, включают, но не ограничиваются ими, US 2013/0190383; и WO 2013/036868, полное содержание каждой из которых настоящим включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент RNAi по изобретению содержит один или несколько мономеров, которые представляют собой нуклеотиды UNA (незакрытая нуклеиновая кислота). UNA представляет собой незакрытую ациклическую нуклеиновую кислоту, в которой любая из связей сахара была удалена, образуя незакрытый «сахарный» остаток. В одном примере UNA также включает мономер с удаленными связями между C1'-C4' (то есть ковалентная связь углерод-кислород-углерод между атомами углерода C1' и C4'). В другом примере связь C2'-C3' (то есть ковалентная углерод-углеродная связь между атомами углерода C2' и C3') сахара была удалена (смотри *Nuc. Acids Symp. Series*, 52, 133-134 (2008) и Fluiter *et al.*, *Mol. Biosyst.*, 2009, 10, 1039, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки).

Типичные публикации США, в которых изучено получение UNA, включают, помимо прочего, US 8314227; и публикации патентов США №№ 2013/0096289; 2013/0011922; и 2011/0313020, полное содержание каждого из указанных включено в настоящее описание посредством ссылки.

Потенциально стабилизирующие модификации концов молекул RNA могут включать N-(ацетиламинокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-C6-NHAc), N-(капроил-4-гидроксипролинол (Нур-C6), N-(ацетил-4-гидроксипролинол (Нур-NHAc), тимидин-2'-О-дезокситимидин (простой эфир), N-(аминокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-C6-амино), 2-докозаноилуридин-3"-фосфат, инвертированное основание dT(idT) и другие. Описание этой модификации может быть найдено в публикации РСТ № WO 2011/005861.

Другие модификации агента RNAi по изобретению включают 5' фосфат или 5' фосфат имитаторы, например, 5'-концевой фосфат или фосфат имитатор на антисмысловой цепи агента RNAi. Подходящие имитаторы фосфатов описаны, например, в Патенте США 2012/0157511, полное содержание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки.

А. Модифицированные агенты RNA-интерференции, содержащие мотивы по изобретению

В некоторых аспектах изобретения агенты двухцепочечной RNAi по изобретению включают агенты с химическими модификациями, как описано, например, в WO

2013/075035, полное содержание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки. Как показано в настоящем документе и в WO 2013/075035, превосходный результат может быть получен путем введения одного или нескольких мотивов трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов в смысловую цепь или антисмысловую цепь агента RNAi, в частности, в сайт расщепления или вблизи него. В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь и антисмысловая цепь агента RNAi могут быть полностью модифицированы. Введение этих мотивов прерывает паттерн модификации, если он присутствует, смысловой или антисмысловой цепи. Агент RNAi может быть необязательно конъюгирован с липофильным лигандом, например лигандом C16, например, на смысловой цепи. Агент RNAi может быть необязательно модифицирован модификацией (S)-гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), например, на одном или нескольких остатках антисмысловой цепи. Полученные агенты RNAi обладают превосходной активностью по подавлению генов.

Соответственно, в описании предложены агенты двухцепочечной RNAi, способные ингибировать экспрессию гена-мишени (то есть гена APOE) *in vivo*. Агент RNAi содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь. Каждая цепь агента RNAi может быть длиной 15-30 нуклеотидов. Например, каждая цепь может быть длиной 16-30 нуклеотидов, длиной 17-30 нуклеотидов, длиной 25-30 нуклеотидов, длиной 27-30 нуклеотидов, длиной 17-23 нуклеотида, длиной 17-21 нуклеотид, длиной 17-19 нуклеотидов, длиной 19-25 нуклеотидов, длиной 19-23 нуклеотида, длиной 19-21 нуклеотид, длиной 21-25 нуклеотидов или длиной 21-23 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая цепь имеет длину 19-23 нуклеотида.

Смысловая цепь и антисмысловая цепь обычно образуют дуплексную двухцепочечную RNA («dsRNA»), также называемую в настоящем документе «агентом RNAi агент». Дуплексная область агента RNAi может иметь длину 15-30 пар нуклеотидов. Например, дуплексная область может иметь длину 16-30 пар нуклеотидов, 17-30 пар нуклеотидов, 27-30 пар нуклеотидов, 17-23 пар нуклеотидов, 17-21 пару нуклеотидов, 17-19 пар нуклеотидов, 19-25 пар нуклеотидов, 19-23 пар нуклеотидов, 19-21 пару нуклеотидов, 21-25 пар нуклеотидов или 21-23 пар нуклеотидов. В другом примере дуплексная область выбрана из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 нуклеотидов в длину. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения дуплексная область имеет длину 19-21 пар нуклеотидов.

В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi может содержать один или несколько выступающих областей или кэпирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах одной или обеих цепей. Выступ может быть длиной 1-6 нуклеотидов, например, 2-6 нуклеотидов, длиной 1-5 нуклеотидов, длиной 2-5 нуклеотидов, длиной 1-4 нуклеотида, длиной 2-4 нуклеотида, длиной 1-3 нуклеотида, длиной 2-3 нуклеотида или длиной 1-2 нуклеотида. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения выступающий участок нуклеотида имеет длину 2 нуклеотида. Выступы могут быть результатом того, что одна цепь длиннее другой, или результатом расположения двух цепей

одинаковой длины в шахматном порядке. Выступ может образовывать ошибочное спаривание с mRNA-мишенью или он может быть комплементарным последовательности целевого гена, или может быть другой последовательностью. Первая и вторая цепи также могут быть соединены, например, дополнительными основаниями для образования шпильки или другими линкерами, не содержащими оснований.

В одном варианте осуществления изобретения каждый из нуклеотидов в выступающей области агента RNAi может независимо представлять собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, включая, помимо прочего, модифицированный 2'-сахар, такой как 2-F, 2'-О-метил, тимидин (Т) и любые их комбинации.

Например, ТТ представлять собой выступающую последовательность для любого конца любой цепи. Выступ может образовывать ошибочное спаривание с mRNA-мишенью или он может быть комплементарным последовательности целевого гена, или может быть другой последовательностью.

5'- или 3'- выступления на смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепях агента RNAi могут быть фосфорилированы. В некоторых вариантах осуществления изобретения выступающий(ие) участок(и) содержит два нуклеотида, содержащих фосфоротиоат между двумя нуклеотидами, где два нуклеотида могут быть одинаковыми или разными. В одном варианте осуществления изобретения выступ присутствует на 3'-конце смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепей. В одном варианте осуществления изобретения этот 3'-выступ присутствует на антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления изобретения этот 3'-выступ присутствует на смысловой цепи.

Агент RNAi может содержать только один выступающий конец, что может усиливать интерференционную активность RNAi, не влияя на ее общую стабильность. Например, одноцепочечный выступающий конец может быть расположен на 3'-конце смысловой цепи или, альтернативно, на 3'-конце антисмысловой цепи. RNAi также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой цепи (или на 3'-конце смысловой цепи) или наоборот. Как правило, антисмысловая цепь RNAi имеет нуклеотидный выступ на 3'-конце, а 5'-конец тупой. Не желая быть связанными теорией, асимметричный тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи и выступающий 3'-конец антисмысловой цепи способствуют загрузке направляющей цепи в процесс RISC.

В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi представляет собой двусторонний тупой элемент длиной 19 нуклеотидов, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-F на трех последовательных нуклеотидах в положениях 7, 8, 9 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по крайней мере один мотив из трех 2'-О-метильных модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В другом варианте осуществления изобретения агент RNAi представляет собой двухконечный тупой элемент длиной 20 нуклеотидов, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-F на трех последовательных

нуклеотидах в положениях 8, 9, 10 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по крайней мере один мотив из трех 2'-О-метильных модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В еще одном варианте осуществления агент RNAi представляет собой двусторонний тупой элемент длиной 21 нуклеотид, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-F на трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца. конец. Антисмысловая цепь содержит по крайней мере один мотив из трех 2'-О-метильных модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi содержит смысловую цепь из 21 нуклеотида и антисмысловую цепь из 23 нуклеотидов, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-F на трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца; антисмысловая цепь содержит по крайней мере один мотив из трех модификаций 2'-О-метила на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца, при этом один конец RNAi тогда как другой конец содержит выступ из 2 нуклеотидов. Предпочтительно, выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи. Когда выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи, могут быть две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами, где два из трех нуклеотидов представляют собой выступающие нуклеотиды, и третий нуклеотид представляет собой спаренный нуклеотид, следующий за выступающим нуклеотидом. В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi дополнительно имеет две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5'-конце смысловой цепи, так и на 5'-конце антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления изобретения каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи агента RNAi, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов, являются модифицированными нуклеотидами. В одном варианте осуществления изобретения каждый остаток независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором, например, в чередующемся мотиве. Необязательно агент RNAi дополнительно содержит лиганд (например, липофильный лиганд, необязательно лиганд C16).

В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi содержит смысловую и антисмысловую цепи, где смысловая цепь имеет длину 25-30 нуклеотидных остатков, при этом начиная с 5'-концевого нуклеотида (положение 1) положения с 1 по 23 первой цепи содержат по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; антисмысловая цепь имеет длину 36-66 нуклеотидных остатков и начиная с 3'-концевого нуклеотида содержит по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1- 23 смысловой цепи с образованием дуплекса; где по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой цепи не спарен со смысловой цепью, и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов не спарены со смысловой цепью, тем самым образуя 3'-концевой одноцепочечный выступ из 1-6 нуклеотидов; при этом 5'-конец антисмысловой цепи содержит от 10 до 30

последовательных нуклеотидов, которые не спарены со смысловой цепью, тем самым образуя одноцепочечный 5'-выступ из 10-30 нуклеотидов; где по меньшей мере 5'-концевой и 3'-концевой нуклеотиды смысловой цепи спарены по основаниям с нуклеотидами антисмысловой цепи, когда смысловая и антисмысловая цепи выровнены для максимальной комплементарности, тем самым образуя по существу дуплексную область между смысловой и антисмысловой цепями; и антисмысловая цепь достаточно комплементарна RNA-мишени по меньшей мере на 19 рибонуклеотидах длины антисмысловой цепи, чтобы снизить экспрессию гена-мишени при введении двухцепочечной нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и при этом смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-F на трех последовательных нуклеотидах, причем по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления или рядом с ним. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-O-метила на трех последовательных нуклеотидах в месте расщепления или рядом с ним.

В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi содержит смысловую и антисмысловую цепи, где агент RNAi содержит первую цепь длиной не менее 25 и не более 29 нуклеотидов и вторую цепь длиной не более 30 нуклеотидов с по меньшей мере одним мотивом из трех 2'-O-метильных модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 с 5'-конца; при этом 3'-конец первой цепи и 5'-конец второй цепи образуют тупой конец, а вторая цепь на 1-4 нуклеотида длиннее на 3'-конце, чем первая цепь, при этом область дуплексного участка, длиной не менее 25 нуклеотидов и вторая цепь достаточно комплементарна mRNA-мишени вдоль по меньшей мере 19 нуклеотидов длины второй цепи для снижения экспрессии гена-мишени при введении агента RNAi в клетку млекопитающего, и при этом расщепление агента RNAi предпочтительно приводит к образованию siRNA, содержащей 3'-конец второй цепи, тем самым снижая экспрессию гена-мишени у млекопитающего. Необязательно, агент RNAi дополнительно содержит лиганд.

В одном варианте осуществления изобретения смысловая цепь агента RNAi содержит по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой цепи.

В одном варианте осуществления изобретения антисмысловая цепь агента RNAi может также содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в месте расщепления антисмысловой цепи или рядом с ним.

Для агента RNAi, имеющего дуплексный участок длиной 17-23 нуклеотида, сайт расщепления антисмысловой цепи обычно находится в положениях 10, 11 и 12 от 5'-конца. Таким образом, мотивы трех одинаковых модификаций могут находиться в 9, 10, 11 положениях; 10, 11, 12 положениях; 11, 12, 13 положениях; 12, 13, 14 положениях; или 13, 14, 15 положениях антисмысловой цепи, отсчет начинается с 1-го нуклеотида с 5'-конца

антисмысловой цепи, или отсчет начинается с 1-го парного нуклеотида в дуплексном участке с 5'-конца антисмысловой цепи. Сайт расщепления в антисмысловой цепи также может изменяться в зависимости от длины дуплексного участка RNAi от 5'-конца.

Смысловая цепь агента RNAi может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления цепи; и антисмысловая цепь может иметь по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов в месте расщепления цепи или рядом с ним. Когда смысловая цепь и антисмысловая цепь образуют дуплекс dsRNA, смысловая цепь и антисмысловая цепь могут быть выровнены таким образом, что один мотив из трех нуклеотидов на смысловой цепи и один мотив из трех нуклеотидов на антисмысловой цепи имеют по крайней мере одно перекрытие нуклеотидов, то есть по меньшей мере один из трех нуклеотидов мотива в смысловой цепи образует пару оснований по крайней мере с одним из трех нуклеотидов мотива в антисмысловой цепи. Альтернативно, по меньшей мере два нуклеотида могут перекрываться или все три нуклеотида могут перекрываться.

В одном варианте осуществления изобретения смысловая цепь агента RNAi может содержать более одного мотива трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах. Первый мотив может встречаться в участке расщепления цепи или около него, и другие мотивы могут представлять собой крыльевые модификации. Термин "крыльевая модификация" в настоящем описании относится к мотиву, располагающемуся на другом участке цепи, который является отделенным от мотива в участке расщепления или около него той же самой цепи. Модификация крыла либо находится рядом с первым мотивом, либо отделена по крайней мере одним или несколькими нуклеотидами. Когда мотивы являются непосредственно примыкающими друг к другу, то химическая структура мотивов отличается друг от друга, и когда мотивы разделены одним или более нуклеотидами, то химические структуры могут быть одинаковыми или различными. Могут присутствовать две или более крыльевых модификаций. Например, когда содержатся две крыльевые модификации, каждая крыльевая модификация может располагаться на одном конце относительно первого мотива, который располагается в участке расщепления или около него, или на любой стороне лидерного мотива.

Аналогично смысловой цепи антисмысловая цепь агента RNAi может содержать по меньшей мере два мотива из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов располагается в участке расщепления или около него цепи. Такая антисмысловая цепь также может содержать одну или более крыльевых модификаций в выравнивании, аналогичном крыльевым модификациям, которые содержатся в смысловой цепи.

В одном варианте осуществления изобретения крыльевая модификация на смысловой цепи или антисмысловой цепи агента RNAi обычно не включает первый один или два концевых нуклеотида на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах цепи.

В другом варианте осуществления изобретения крыльевая модификация на смысловой цепи или антисмысловой цепи агента RNAi обычно не включает первый один или два спаренных нуклеотида в дуплексной области на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах цепи.

Когда смысловая цепь и антисмысловая цепь агента RNAi, каждая, содержат по меньшей мере одну крыльевую модификацию, крыльевые модификации могут находиться на одном и том же конце дуплексной области и содержать перекрывание одного, двух или трех нуклеотидов.

Когда смысловая цепь и антисмысловая цепь агента RNAi, каждая, содержат по меньшей мере две крыльевые модификации, смысловая цепь и антисмысловая цепь могут являться выровненными таким образом, что две модификации, каждая из одной цепи, находятся на одном конце дуплексной области с перекрыванием одного, двух или трех нуклеотидов; две модификации, каждая из одной цепи, находятся на другом конце дуплексной области с перекрыванием одного, двух или трех нуклеотидов; две модификации одной цепи находятся на каждой стороне лидерного мотива с перекрыванием одного, двух или трех нуклеотидов в дуплексной области.

В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi содержит ошибочное спаривание(я) с мишенью в дуплексе или их комбинации. Ошибочное спаривание может находиться в области выступа или дуплексной области. Пару оснований можно классифицировать на основании ее способности способствовать диссоциации или плавлению (например, в отношении свободной энергии ассоциации или диссоциации конкретного спаривания, наиболее простой подход представляет собой такой, как на основании индивидуальных пар независимо от соседа, или также можно использовать аналогичный анализ). В отношении возможности способствовать диссоциации: A:U является предпочтительным чем G:C; G:U является предпочтительным чем G:C; и I:C является предпочтительным чем G:C (I=инозин). Ошибочные спаривания, например, неканонические или отличные от канонического спаривания (как описано где-либо в настоящем описании) являются предпочтительными по сравнению с каноническими (A:T, A:U, G:C) спариваниями; и спаривания, которые содержат универсальное основание, являются предпочтительными по сравнению с каноническим спариванием.

В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в дуплексных областях от 5'-конца антисмысловой цепи, которые независимо выбраны из группы: A:U, G:U, I:C и пар ошибочных спариваний, например, неканонических или отличных от канонических спариваний или спариваний, которые содержат универсальное основание, для обеспечения диссоциации антисмысловой цепи в 5'-конце дуплекса.

В одном варианте осуществления изобретения нуклеотид в положении 1 в дуплексной области от 5'-конца в антисмысловой цепи выбран из группы, состоящей из A, dA, dU, U и dT. Альтернативно, по меньшей мере одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований в дуплексной области от 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований

AU. Например, первая пара оснований в дуплексной области от 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU.

В другом варианте осуществления изобретения нуклеотид на 3'-конце смысловой цепи представляет собой дезокситимидин (dT). В другом варианте осуществления изобретения нуклеотид на 3'-конце антисмысловой цепи представляет собой дезокситимидин (dT). В одном варианте осуществления изобретения имеется короткая последовательность дезокситимидиновых нуклеотидов, например, два нуклеотида dT на 3'-конце смысловой или антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления изобретения последовательность смысловой цепи может быть представлена формулой (I):



где:

i и j , каждый, независимо, обозначают 0 или 1;

p и q , каждый, независимо, обозначают 0-6;

каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, причем каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

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

каждый N_p и N_q независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

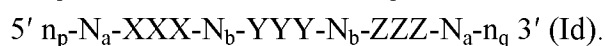
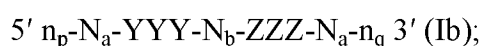
где N_b и Y не имеют одинаковых модификаций; и

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

В одном варианте осуществления изобретения N_a или N_b содержат модификации паттерна чередования.

В одном варианте осуществления изобретения мотив YYY находится в участке расщепления смысловой цепи или рядом с ним. Например, когда агент RNAi имеет дуплексный участок длиной 17-23 нуклеотида, мотив YYY может встречаться в участке расщепления смысловой цепи или рядом с ним (например, может встречаться в положениях 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 или 11, 12, 13), отсчет начинается с 1-го нуклеотида, с 5'-конца; или, необязательно, подсчет начинается с 1-й пары нуклеотидов в дуплексной области 5'-конца.

В одном варианте осуществления изобретения i обозначает 1 и j обозначает 0, или i обозначает 0 и j обозначает 1, или оба i и j обозначают 1. Таким образом, смысловая цепь может быть представлена следующими формулами:



Когда смысловая цепь представлена формулой (Ib), N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов.

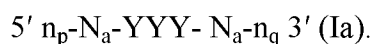
Каждый N_a независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда смысловая цепь представлена в виде формулы (Ic), N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a может независимо представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда смысловая цепь представлен в виде формулы (Id), каждый N_b независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно, N_b обозначает 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Каждый N_a может независимо представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

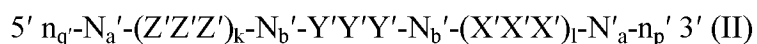
Каждый из X, Y и Z может быть одинаковым или отличным друг от друга.

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



Когда смысловая цепь представлен формулой (Ia), каждый N_a независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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



где:

k и l , каждый, независимо, обозначают 0 или 1;

p' и q' , каждый, независимо, обозначают 0-6;

каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, причем каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

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

каждый N_p' и N_q' независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

где N_b' и Y' не имеют одинаковых модификаций;

и

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

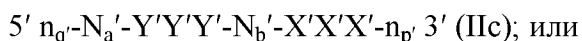
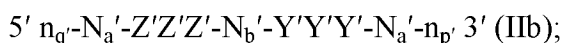
В одном варианте осуществления изобретения N_a' или N_b' содержат модификации паттерна чередования.

Мотив $Y'Y'Y'$ находится в участке расщепления антисмысловой цепи или рядом с ним. Например, когда агент $RNAi$ имеет дуплексный участок длиной 17-23 нуклеотида, мотив $Y'Y'Y'$ может встречаться в положениях 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; или 13, 14, 15 антисмысловой цепи, с началом отсчета с 1-го нуклеотида с 5'-конца; или, необязательно, отсчет начинается с 1-го парного нуклеотида в дуплексном участке с 5'-конца. Предпочтительно, мотив $Y'Y'Y'$ встречается в положениях 11, 12, 13.

В одном варианте осуществления изобретения мотив $Y'Y'Y'$ представляет собой все 2'-ОМе модифицированных нуклеотиды.

В одном варианте осуществления изобретения k обозначает 1 и l обозначает 0, или k обозначает 0 и l обозначает 1, или оба k и l обозначают 1.

Таким образом, антисмысловая цепь может быть представлена следующими формулами:

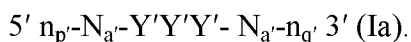


Когда антисмысловая цепь представлена формулой (IIb), N_b' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15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

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

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

В других вариантах осуществления изобретения k обозначает 0 и l обозначает 0 и антисмысловая цепь может быть представлена формулой:



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

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

Каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи может быть независимо модифицирован LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтил, 2'-О-метил, 2'-О-аллил, 2'-С-аллил, 2'-гидроксил, или 2'-фтор. Например, каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором. Каждый X, Y, Z, X', Y' и Z', в частности, может представлять собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию.

В одном варианте осуществления изобретения смысловая цепь агента RNAi может содержать мотив YYY, встречающийся в положениях 9, 10 и 11 цепи, когда дуплексная область составляет 21 нуклеотид, отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца, или необязательно, отсчет начинается с 1-го парного нуклеотида в дуплексном участке с 5'-конца; и Y представляет собой 2'-F модификацию. Смысловая цепь может дополнительно содержать мотив XXX или мотивы ZZZ в качестве крыльевой модификации на противоположном конце дуплексной области; и XXX и ZZZ, каждый, независимо, представляет собой 2'-ОМе модификацию или 2'-F модификацию.

В одном варианте осуществления изобретения антисмысловая цепь может содержать мотив Y'Y'Y', встречающийся в положениях 11, 12, 13 цепи, отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца, или необязательно, отсчет начинается с 1-го парного нуклеотида в дуплексном участке с 5'-конца; и Y' представляет собой 2'-О-метил-модификацию. Антисмысловая цепь может дополнительно содержать мотив X'X'X' или мотивы Z'Z'Z' в качестве крыльевой модификации на противоположном конце дуплексной области; и X'X'X' и Z'Z'Z', каждый, независимо, представляют собой 2'-ОМе модификацию или 2'-F модификацию.

Смысловая цепь, представленная любой из приведенных выше формул (Ia), (Ib), (Ic) и (Id), образует дуплекс с антисмысловой цепью, представленной любой из формул (IIa), (IIb), (Ic) и (Id), соответственно.

Соответственно, агенты RNAi для применения в способах по изобретению могут содержать смысловую цепь и антисмысловую цепь, каждая из которых содержит от 14 до 30 нуклеотидов, причем дуплекс RNAi представлен формулой (III):

смысловая:	$5' n_p\text{-}N_a\text{-(XXX)}_i\text{-}N_b\text{-}YYY\text{-}N_b\text{-(ZZZ)}_j\text{-}N_a\text{-}n_q 3'$
антисмысловая:	$3' n_p'\text{-}N_a'\text{-(X'X'X')}_{i'}\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-(Z'Z'Z')}_{j'}\text{-}N_a'\text{-}n_q' 5'$

(III)

где:

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

p, p', q и q', каждый, независимо, обозначают 0-6;

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

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

где

каждый N_p' , n_p , n_q' , и N_q , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляют собой выступающий нуклеотид; и

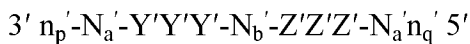
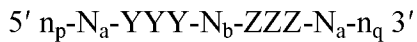
XXX , YYY , ZZZ , $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ и $Z'Z'Z'$, каждый, независимо, представляют собой один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления изобретения i обозначает 0 и j обозначает 0; или i обозначает 1 и j обозначает 0; или i обозначает 0 и j обозначает 1; или оба i и j обозначают 0; или оба i и j обозначают 1. В другом варианте осуществления изобретения k обозначает 0 и l обозначает 0; или k обозначает 1 и l обозначает 0; k обозначает 0 и l обозначает 1; или оба k и l обозначают 0; или оба k и l обозначают 1.

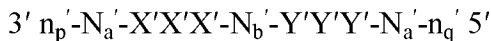
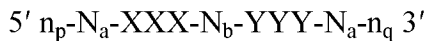
Примеры комбинаций смысловой цепи и антисмысловой цепи, образующих дуплекс RNA_i , включают следующие формулы:



(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



(IIIId)

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

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

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

Когда агент RNA_i представлен в виде формулы (IIIId), каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a , N_a' независимо

представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждый из N_a , N_a' , N_b и N_b' независимо содержит модификации паттерна чередования.

В одном варианте осуществления изобретения, когда агент RNAi представлен формулой (III_d), модификации N_a представляют собой 2'-О-метил или 2'-фтор модификации. В другом варианте осуществления изобретения, когда агент RNAi представлен формулой (III_d), модификации N_a представляют собой 2'-О-метил или 2'-фтор модификации и $N_{p'} > 0$ и по меньшей мере один $n_{p'}$ связан с соседним нуклеотидом а посредством фосфоротиоатной связи. В еще одном варианте осуществления изобретения, когда агент RNAi представлен формулой (III_d), модификации N_a представляют собой 2'-О-метил или 2'-фтор модификации, $n_{p'} > 0$ и по меньшей мере один $n_{p'}$ связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи, а смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими фрагментами C16 (или родственными), присоединенными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер (описано ниже). В другом варианте осуществления изобретения, когда агент RNAi представлен формулой (III_d), модификации N_a представляют собой 2'-О-метил или 2'-фтор модификации, $n_{p'} > 0$ и по меньшей мере один $n_{p'}$ связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи, смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими липофильными, например, C16 (или родственными) фрагментами, необязательно присоединенными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В одном варианте осуществления изобретения, когда агент RNAi представлен формулой (III_a), модификации N_a представляют собой 2'-О-метил или 2'-фтор модификации, $n_{p'} > 0$ и по меньшей мере один $n_{p'}$ связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи, смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими липофильными, например, C16 (или родственными) фрагментами, присоединенными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi представляет собой мультимер, содержащий по меньшей мере два дуплекса, представленных формулами (III), (III_a), (III_b), (III_c) и (III_d), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно, мультимер дополнительно содержит линкер. Каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген или на два разных гена; или каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген в двух разных сайтах-мишенях.

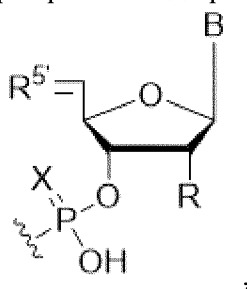
В одном варианте осуществления изобретения агент RNAi представляет собой мультимер, содержащий три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулами (III), (III_a), (III_b), (III_c) и (III_d), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно, мультимер дополнительно содержит линкер. Каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот

же ген или на два разных гена; или каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген в двух разных сайтах-мишенях.

В одном варианте осуществления изобретения два агента RNAi, представленные формулами (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), связаны друг с другом на 5'-конце, и один или оба 3'-конца и необязательно конъюгированы с лигандом. Каждый из агентов может быть нацелен на один и тот же ген или на два разных гена; или каждый из агентов может нацеливаться на один и тот же ген в двух разных сайтах-мишенях.

В различных публикациях описываются мультимерные агенты RNAi, которые можно использовать в способах согласно настоящему изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 и WO2011/031520; а также US 7858769, полное содержание каждого из указанных включено в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции и способы по изобретению включают винилфосфонатную (VP) модификацию агента RNAi, описанную в настоящем документе. В типичных вариантах осуществления изобретения 5'-винилфосфонат-модифицированный нуклеотид по изобретению имеет структуру:



где X представляет собой O или S;

R представляет собой водород, гидроксильную группу, фтор, или C₁₋₂₀алкокси (например, метокси или н-гексадецилокси);

R^{5'} представляет собой =C(H)-P(O)(OH)₂, и двойная связь между углеродом C5' и R^{5'} имеет ориентацию E или Z (например, ориентацию E); и

B представляет собой азотистое основание или модифицированное азотистое основание, где, необязательно, B представляет собой аденин, гуанин, цитозин, тимин или урацил.

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

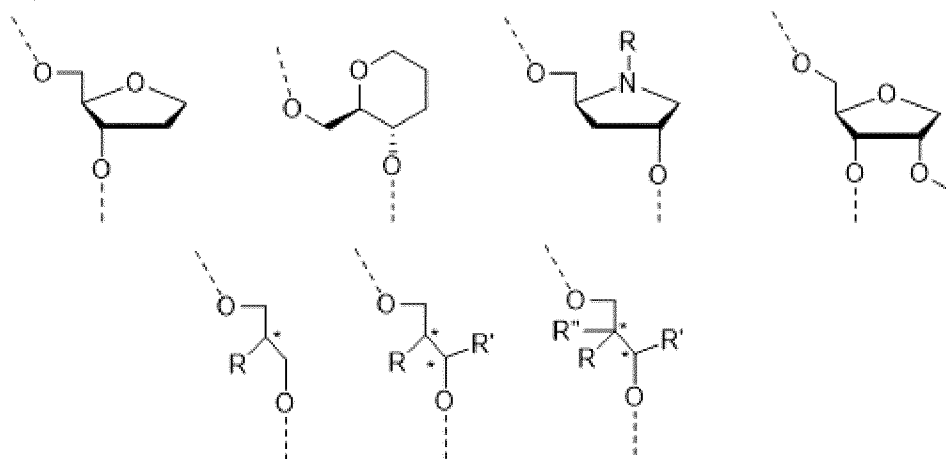
Винилфосфат-модификации также предусмотрены для композиций и способов согласно настоящему описанию. Типичная структура винилфосфата включает предыдущую структуру, где R^{5'} представляет собой =C(H)-OP(O)(OH)₂ и двойная связь между углеродом C5' и R^{5'} имеет ориентацию E или Z (например, ориентацию E).

Е. Термодестабилизирующие модификации

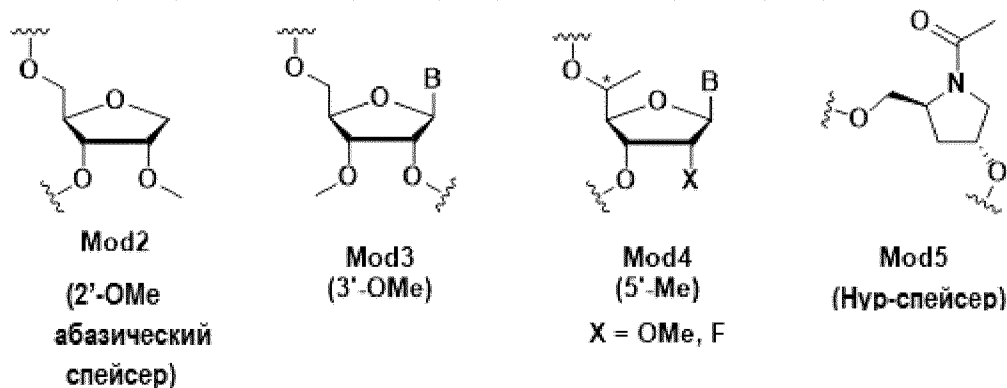
В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA может быть оптимизирована для RNA-интерференции путем включения термически дестабилизирующих модификаций в исходную область антисмысловой цепи (то есть в положениях 2-9 5'-конца антисмысловой цепи) для снижения или ингибирования -молчание генов-мишеней. Было обнаружено, что dsRNA с антисмысловой цепью, содержащей по крайней мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца антисмысловой цепи, обладают пониженной активностью подавления нецелевого гена. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять или более) термодестабилизирующую модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений 5'-области антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна или несколько термически дестабилизирующих модификаций дуплекса расположены в положениях 2-9 или предпочтительно в положениях 4-8 от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых дополнительных вариантах осуществления термически дестабилизирующая(ие) модификация(и) дуплекса находится в положении 6, 7 или 8 от 5'-конца антисмысловой цепи. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса расположена в положении 7 от 5'-конца антисмысловой цепи. Термин «термически дестабилизирующая(ие) модификация(и)» включает модификацию(и), которая приводит к получению dsRNA без такой модификации(й). В некоторых вариантах осуществления изобретения термически дестабилизирующая модификация дуплекса расположена в положении 2, 3, 4, 5 или 9 от 5'-конца антисмысловой цепи.

Термически дестабилизирующие модификации могут включать, но не ограничиваются ими, абазическую модификацию; ошибочные спаривания с противоположным нуклеотидом в противоположной цепи; и модификацию сахара, такую как 2'-дезоксимодификация или ациклический нуклеотид, например, разблокированные нуклеиновые кислоты (UNA) или гликолевая нуклеиновая кислота (GNA).

Примеры абазической модификации включают, но этим не ограничиваются, следующим:

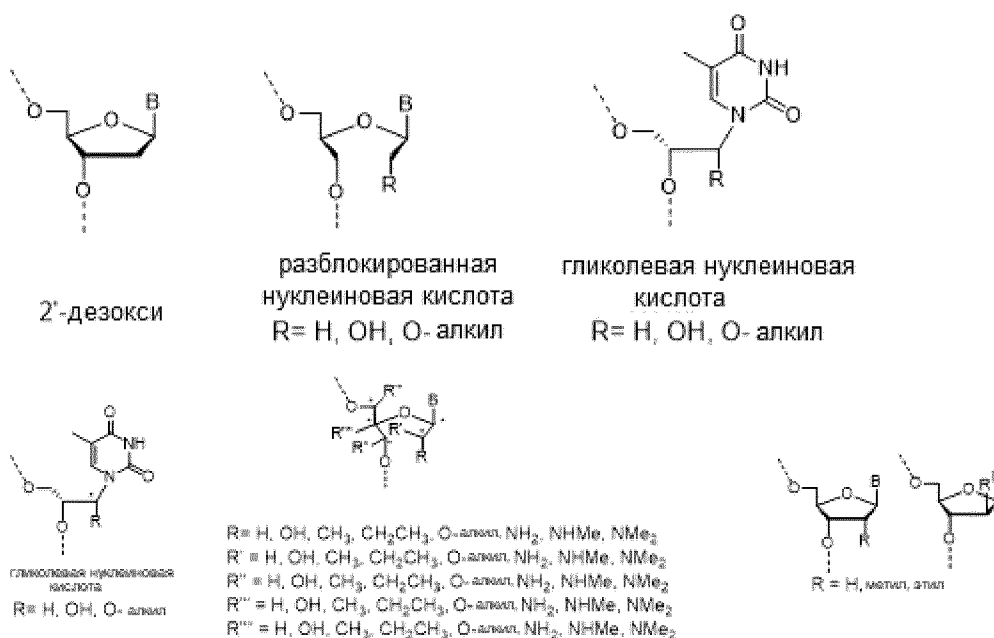


где R=H, Me, Et или OMe; R'=H, Me, Et или OMe; R''=H, Me, Et или OMe



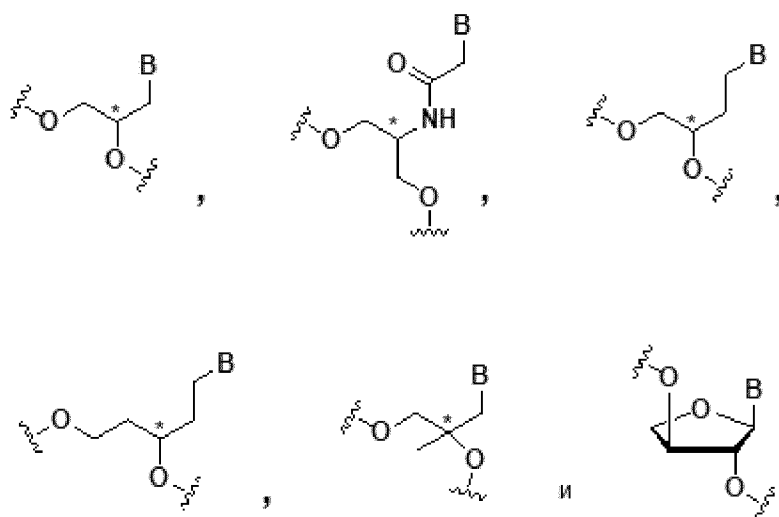
где В представляет собой модифицированное или немодифицированное азотистое основание.

Примеры модификаций сахара включают, но не ограничиваются следующими:



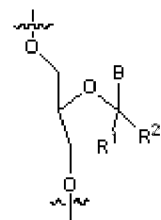
где В представляет собой модифицированное или немодифицированное азотистое основание.

В некоторых вариантах осуществления изобретения термически дестабилизирующая модификация дуплекса выбрана из группы, включающей:

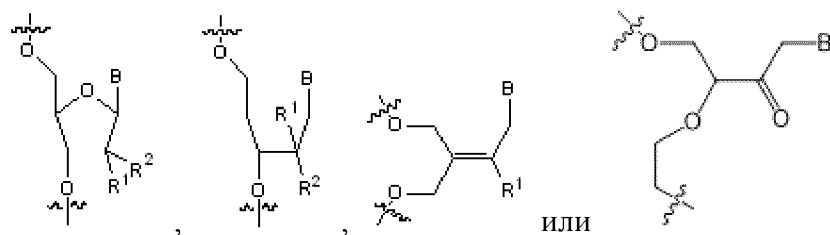


где В представляет собой модифицированное или немодифицированное азотистое основание и звездочка в каждой структуре обозначает либо *R*, *S*, либо *рацемический*.

Термин «ациклический нуклеотид» относится к любому нуклеотиду, имеющему ациклический сахар рибозы, например, где любая из связей между атомами углерода рибозы (например, C1'-C2', C2'-C3', C3'-C4', C4'-O4' или C1'-O4') отсутствует или по крайней мере один из атомов углерода рибозы или кислорода (например, C1', C2', C3', C4' или O4') независимо или в комбинации отсутствует в нуклеотиде. В некоторых вариантах



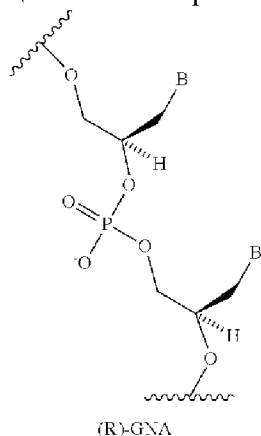
осуществления изобретения ациклический нуклеотид представляет собой



, где В представляет собой модифицированное или немодифицированное азотистое основание, R^1 и R^2 независимо представляют собой H, галоген, OR_3 или алкил; и R_3 представляет собой H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар). Термин «UNA» относится к разблокированной ациклической нуклеиновой кислоте, в которой любая из связей сахара была удалена, образуя разблокированный «сахарный» остаток. В одном примере UNA также охватывает мономеры с удаленными связями между C1'-C4' (то есть ковалентная связь углерод-кислород-углерод между атомами углерода C1' и C4'). В другом примере связь C2'-C3' (то есть ковалентная углерод-углеродная связь между атомами углерода C2' и C3') сахара удаляется (см. Mikhailov et. al., Tetrahedron Letters, 26 (17): 2059 (1985); и Fluiter

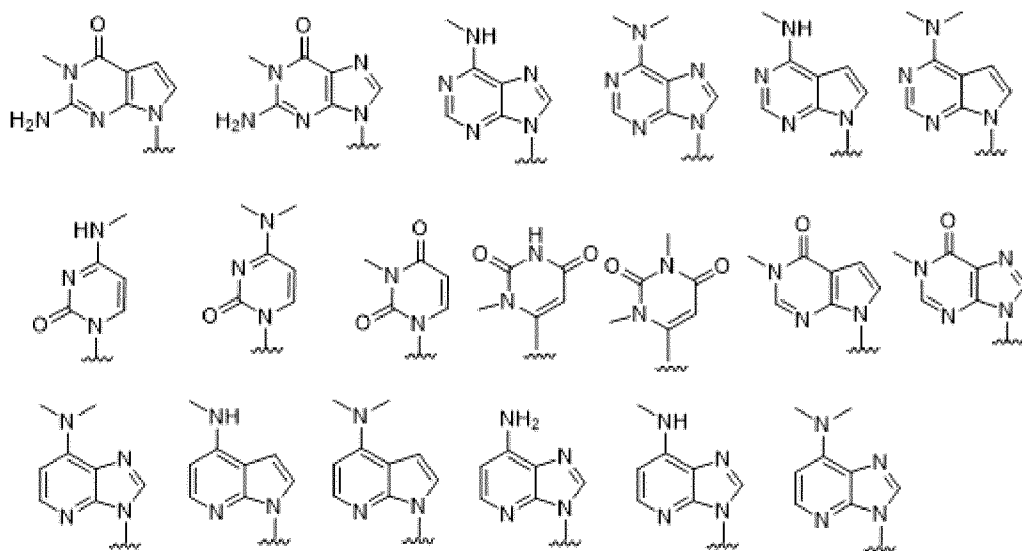
et al., Mol. Biosyst., 10: 1039 (2009), которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Ациклическое производное обеспечивает большую гибкость структуры, не влияя на пары Уотсона-Крика. Ациклический нуклеотид может быть связан через 2'-5' или 3'-5' связь.

Термин «GNA» относится к гликолевой нуклеиновой кислоте, которая представляет собой полимер, подобный DNA или RNA, но отличающийся составом своей «структуры», состоящего из повторяющихся единиц глицерина, связанных фосфодиэфирными связями:



Термически дестабилизирующая модификация дуплекса может представлять собой ошибочные спаривания (то есть некомплементарные пары оснований) между термически дестабилизирующим нуклеотидом и противоположным нуклеотидом в противоположной цепи внутри дуплекса dsRNA. Примеры ошибочных спариваний пар оснований включают G:G, G:A, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U, C:T, U:U, T:T, U:T или их комбинация. Другие ошибочные спаривания пары оснований, известные в данной области, также попадают в объем настоящего изобретения. Ошибочное спаривание может встречаться между нуклеотидами, которые являются либо природными нуклеотидами, либо модифицированными нуклеотидами, то есть ошибочное спаривание оснований может встречаться между азотистыми основаниями соответствующих нуклеотидов независимо от модификаций рибозных сахаров нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA содержит по меньшей мере одно азотистое основание в ошибочном спаривании оснований, которое представляет собой 2'-дезоксинуклеотидное основание; например, 2'-дезоксинуклеотидное основание находится в смысловой цепи.

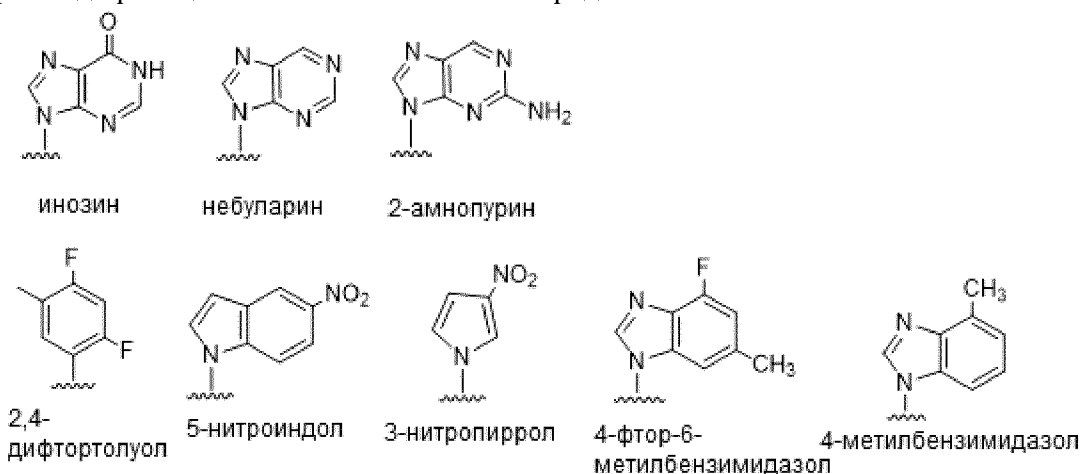
В некоторых вариантах осуществления изобретения термически дестабилизирующая модификация дуплекса в участке узнавания мишени антисмысловой цепи включает нуклеотиды с нарушенной связью W-C H с комплементарным основанием на mRNA-мишени, такие как:



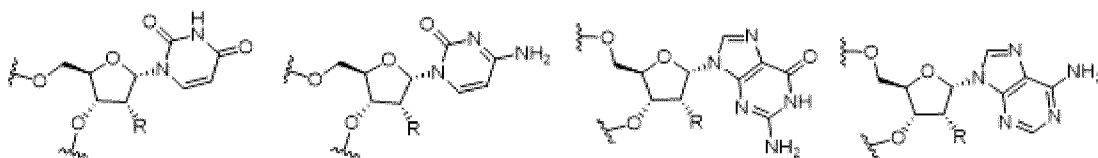
Другие примеры модификаций ациклических нуклеотидов, ациклических нуклеотидов (включая UNA и GNA) и модификаций несоответствия подробно описаны в WO 2011/133876, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

К термически дестабилизирующим модификациям могут относиться также универсальные основания с пониженной или отсутствующей способностью образовывать водородные связи с противоположными основаниями и фосфатные модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения термически дестабилизирующая модификация дуплекса включает нуклеотиды с неканоническими основаниями, такие как, помимо прочего, модификации азотистых оснований с нарушенной или полностью устраненной способностью образовывать водородные связи с основаниями в противоположной цепи. Эти модификации азотистых оснований оценивали на предмет дестабилизации центральной области дуплекса dsRNA, как описано в WO 2010/0011895, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Примеры модификаций азотистых оснований представляют собой:

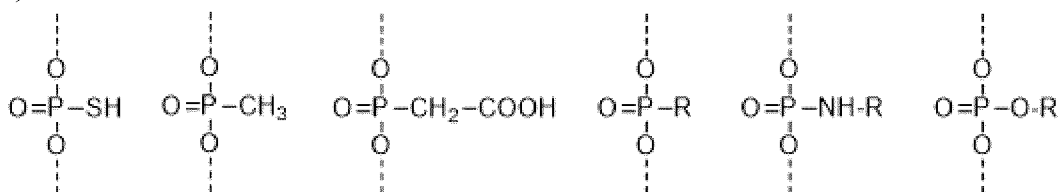


В некоторых вариантах осуществления изобретения термически дестабилизирующая модификация дуплекса в участке узнавания мишени антисмысловой цепи включает один или несколько α -нуклеотидов, комплементарных основанию mRNA-мишень, такие как:



где R представляет собой H, OH, OCH₃, F, NH₂, NHMe, NMe₂ или O-алкил.

Примеры фосфатных модификаций, которые, как известно, снижают термостабильность дуплексов dsRNA по сравнению с природными фосфодиэфирными связями, включают:



R = алкил

Алкил для группы R может представлять собой C₁-C₆алкил. Конкретные алкилы для группы R включают, но не ограничиваются ими, метил, этил, пропил, изопропил, бутил, пентил и гексил.

Как будет понятно специалисту в данной области техники, ввиду функциональной роли азотистых оснований, определяющей специфичность агента RNAi по изобретению, в то время как модификации азотистых оснований могут быть выполнены различными способами, как описано в настоящем документе, например, для введения дестабилизирующих модификаций в агент RNAi по изобретению, например, с целью усиления действия на мишень по сравнению с эффектом вне мишени диапазон доступных модификаций и, как правило, присутствующих в агентах RNAi по изобретению, имеет тенденцию быть намного больше для модификаций, не связанных с азотистыми основаниями, например, модификаций сахарных групп или фосфатные остовы полирибонуклеотидов. Такие модификации более подробно описаны в других разделах настоящего описания и явно предусмотрены для агентов RNAi по изобретению, содержащих либо нативные азотистые основания, либо модифицированные азотистые основания, как описано выше или где-либо в данном документе.

В дополнение к антисмысловой цепи, содержащей термически дестабилизирующую модификацию, dsRNA также может содержать одну или несколько стабилизирующих модификаций. Например, dsRNA может содержать по меньшей мере две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующих модификаций. Без ограничений все стабилизирующие модификации могут присутствовать в одной цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения как смысловая, так и антисмысловая цепи содержат по меньшей мере две стабилизирующие модификации. Стабилизирующая модификация может происходить на любом нуклеотиде смысловой цепи или антисмысловой цепи. Например, стабилизирующая модификация может происходить на каждом нуклеотиде смысловой или антисмысловой цепи; каждая стабилизирующая модификация может иметь чередующийся характер на смысловой цепи или антисмысловой

цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь содержат обе стабилизирующие модификации в чередующемся порядке. Схема чередования стабилизирующих модификаций смысловой цепи может быть такой же или отличной от антисмысловой цепи, а схема чередования стабилизирующих модификаций смысловой цепи может иметь сдвиг относительно схемы чередования стабилизирующих модификаций антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь содержит по меньшей мере две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующих модификаций. Без ограничений стабилизирующая модификация антисмысловой цепи может присутствовать в любых положениях. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловые модификации содержат стабилизирующие модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 от 5'-конца. В некоторых других вариантах осуществления изобретения антисмысловая включает стабилизирующие модификации в положениях 2, 6, 14 и 16 от 5'-конца. В еще некоторых других вариантах осуществления изобретения антисмысловая включает стабилизирующие модификации в положениях 2, 14 и 16 от 5'-конца.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну стабилизирующую модификацию, расположенную рядом с дестабилизирующей модификацией. Например, стабилизирующей модификацией может быть нуклеотид на 5'-конце или 3'-конце дестабилизирующей модификации, то есть в положении -1 или +1 от положения дестабилизирующей модификации. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь содержит стабилизирующую модификацию на каждом из 5'-конца и 3'-конца дестабилизирующей модификации, то есть в положениях -1 и +1 от положения дестабилизирующей модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь содержит по меньшей мере две стабилизирующие модификации на 3'-конце дестабилизирующей модификации, то есть в положениях +1 и +2 от положения дестабилизирующей модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь содержит по меньшей мере две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующих модификаций. Без ограничений, стабилизирующая модификация смысловой цепи может присутствовать в любых положениях. В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 7, 10 и 11 от 5'-конца. В некоторых других вариантах осуществления изобретения смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 7, 9, 10 и 11 от 5'-конца. В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12 и 15 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых других вариантах осуществления изобретения смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12, 13 и 15 антисмысловой цепи,

считая от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь содержит блок из двух, трех или четырех стабилизирующих модификаций.

В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь не содержит стабилизирующей модификации в положении, противоположном или комплементарном термически дестабилизирующей модификации дуплекса в антисмысловой цепи.

Примеры термостабилизирующих модификаций включают, но этим не ограничиваются, 2'-фтор-модификации. Другие термостабилизирующие модификации включают, но этим не ограничиваются, LNA.

В некоторых вариантах осуществления изобретения dsRNA по изобретению содержит по меньшей мере четыре (например, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) 2'-фторнуклеотидов. Без ограничений, 2'-фторнуклеотиды все могут присутствовать в одной цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения как смысловая, так и антисмысловая цепи содержат по меньшей мере два 2'-фторнуклеотида. 2'-фтор-модификация может встречаться на любом нуклеотиде смысловой цепи или антисмысловой цепи. Например, 2'-фтор-модификация может встречаться на каждом нуклеотиде смысловой цепи или антисмысловой цепи; каждая 2'-фтор-модификация может встречаться в паттерне чередования на смысловой цепи или антисмысловой цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь содержит обе 2'-фтор модификации в паттерне чередования. Паттерн чередования 2'-фтор-модификаций на смысловой цепи может быть таким же или отличным от антисмысловой цепи, и паттерн чередования 2'-фтор-модификаций на смысловой цепи может иметь сдвиг относительно паттерна чередования 2'-фтор-модификаций на антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь содержит по меньшей мере два (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) 2'-фторнуклеотидов. Без ограничений, 2'-фтор-модификация в антисмысловой цепи может присутствовать в любом положении. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловой фрагмент содержит 2'-фторнуклеотида в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 от 5'-конца. В некоторых других вариантах осуществления изобретения антисмысловой фрагмент содержит 2'-фторнуклеотида в положениях 2, 6, 14 и 16 от 5'-конца. В еще некоторых других вариантах осуществления изобретения антисмысловой фрагмент содержит 2'-фторнуклеотида в положениях 2, 14 и 16 от 5'-конца.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один 2'-фторнуклеотид, смежный с дестабилизирующей модификацией. Например, 2'-фторнуклеотид может быть нуклеотидом на 5'-конце или на 3'-конце дестабилизирующей модификации, то есть в положении -1 или +1 от положения дестабилизирующей модификации. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь содержит а 2'-фторнуклеотид на каждом 5'-конце и 3'-конце дестабилизирующей модификации, то есть в положениях -1 и +1 от положения дестабилизирующей модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь содержит по меньшей мере два 2'-фторнуклеотида на 3'-конце дестабилизирующей модификации, то есть в положениях +1 и +2 от положения дестабилизирующей модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь содержит по меньшей мере два (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) 2'-фторнуклеотидов. Без ограничений, 2'-фтор-модификация в смысловой цепи может присутствовать в любом положении. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловый фрагмент содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 7, 10 и 11 от 5'-конца. В некоторых других вариантах осуществления изобретения смысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 7, 9, 10 и 11 от 5'-конца. В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12 и 15 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых других вариантах осуществления изобретения смысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12, 13 и 15 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь содержит а блок из двух, трех или четырех 2'-фторнуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь не содержит 2'-фторнуклеотид в положении, противоположном или комплементарном термически дестабилизирующей модификации дуплекса в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA по изобретению содержит смысловую цепь из 21 нуклеотида (нт) и антисмысловую цепь из 23 нуклеотидов (нт), где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один термически дестабилизирующий нуклеотид, где по меньшей мере один термически дестабилизирующий нуклеотид встречается в затравочный участок антисмысловой цепи (то есть в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи), где один конец dsRNA является тупым, а другой конец содержит 2 нуклеотидных выступа, и где dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловой фрагмент содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловой фрагмент содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с линкером; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи. Предпочтительно, 2 нуклеотидных выступа находятся на 3'-конце антисмыслового фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA по изобретению содержит смысловую и антисмысловую цепи, где смысловая цепь имеет длину 25-30 нуклеотидных остатков, причем, начиная с 5'-концевого нуклеотида

(положение 1), положения с 1 по 23 указанного смысловая цепь содержит по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; антисмысловая цепь имеет длину 36-66 нуклеотидных остатков и, начиная с 3'-концевого нуклеотида, не менее 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1-23 смысловой цепи с образованием дуплекса; где по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой цепи не спарен со смысловой цепью, и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов не спарены со смысловой цепью, тем самым образуя 3'-концевой выступающий конец из 1-6 нуклеотидов; при этом 5'-конец антисмысловой цепи содержит от 10 до 30 последовательных нуклеотидов, которые не спарены со смысловой цепью, тем самым образуя одноцепочечный 5'-выступ из 10-30 нуклеотидов; где по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой цепи спарены по основаниям с нуклеотидами антисмысловой цепи, когда смысловая и антисмысловая цепи выровнены для максимальной комплементарности, тем самым образуя по существу дуплексную область между смысловой и антисмысловой цепями; и антисмысловая цепь является достаточно комплементарной RNA-мишени вдоль по меньшей мере 19 рибонуклеотидов длины антисмысловой цепи для снижения экспрессии гена-мишени при введении указанной двухцепочечной нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один термически дестабилизирующий нуклеотид, где по меньшей мере один термически дестабилизирующий нуклеотид находится на участке узнавания мишени антисмысловой цепи (то есть в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи). Например, термически дестабилизирующий нуклеотид встречается между положениями, противоположными или комплементарными положениям 14-17 5'-конца смысловой цепи, и где dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловой фрагмент содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловой фрагмент содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с линкером; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) dsRNA содержит дуплексный участок из 12-30 пар нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA по изобретению содержит смысловую и антисмысловую цепи, где указанная молекула dsRNA содержит смысловую цепь длиной не менее 25 и не более 29 нуклеотидов и антисмысловую цепь длиной не более 30 нуклеотидов, где смысловая цепь содержит модифицированный нуклеотид, который подвержен ферментативному расщеплению в положении 11 с 5'-конца, при этом 3'-конец указанной смысловой цепи и 5'-конец указанной антисмысловой цепи образуют тупой конец, а указанная антисмысловая цепь представляет собой на 1-4 нуклеотида длиннее на своем 3'-конце, чем смысловая цепь, при этом дуплексная область имеет длину не менее 25 нуклеотидов, и указанная антисмысловая цепь достаточно комплементарна целевой mRNA по меньшей мере на 19 нуклеотидов указанной

антисмысловой цепи, для снижения экспрессии гена-мишени, когда указанная молекула dsRNA вводится в клетку млекопитающего, и при этом расщепление указанной dsRNA дайсером предпочтительно приводит к образованию siRNA, содержащей указанный 3'-конец указанной антисмысловой цепи, тем самым снижая экспрессию гена-мишени у млекопитающего, при этом антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один термически дестабилизирующий нуклеотид, где по меньшей мере один термически дестабилизирующий нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой цепи (то есть в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи), и где dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловой фрагмент содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловой фрагмент содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с линкером; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) dsRNA имеет дуплексный участок из 12-29 пар нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый нуклеотид в смысловой и антисмысловой цепях молекулы dsRNA может быть модифицирован. Каждая нуклеотид может быть модифицирован одной и той же или другой модификацией, которая может включать одно или несколько изменений одного или обоих несвязывающих атомов кислорода фосфата или одного или нескольких связывающих атомов кислорода фосфата; изменение компонента рибозного сахара, например, 2' гидроксила рибозного сахара; полная замена фосфатного фрагмента линкерами «дефосфо»; модификация или замена природного основания; и замена или модификация рибозо-фосфатного остова.

Поскольку нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры субъединиц, многие из модификаций происходят в положении, которое повторяется внутри нуклеиновой кислоты, например, модификация основания или фосфатного фрагмента, или несвязывающего О фосфатного фрагмента. В некоторых случаях модификация будет происходить во всех положениях субъекта в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях этого не произойдет. Например, модификация может происходить только в 3'- или 5'-концевом положении, может происходить только в концевой области, например, в положении на концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидов цепи. Модификация может происходить в области двухцепочечной, одноцепочечной области или в обеих. Модификация может происходить только в двухцепочечной области RNA или может происходить только в одноцепочечной области RNA. Например, фосфоротиоатная модификация в несвязывающем положении О может происходить только на одном или обоих концах, может происходить только в концевой области, например, в положении на концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидов в цепи, или может встречаться в двухцепочечных и одноцепочечных областях, особенно на концах. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированы.

Возможно, например, повысить стабильность, включить определенные основания в выступы или включить модифицированные нуклеотиды или заменители нуклеотидов в одноцепочечные выступы, например, в 5'- или 3'-выступы, или в оба варианта. Например, может быть желательно включить пуриновые нуклеотиды в выступы. В некоторых вариантах осуществления изобретения все или некоторые основания в выступающем 3'-или 5'-конце могут быть модифицированы, например, модификацией, описанной в настоящем документе. Модификации могут включать, например, использование модификаций в положении 2' рибозного сахара с модификациями, известными в данной области, например, использование дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезоксид-2'-фтор- (2'-F) или 2'-О-метил-модифицированных вместо рибосахара азотистого основания, и модификации в фосфатной группе, например, фосфоротиоатные модификации. Выступы не обязательно должны быть гомологичны мишени последовательности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтил, 2'-О-метил, 2'-О-аллил, 2'-С-аллил, 2'-деокси или 2'-фтор. Цепи могут содержать более одной модификации. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором. Следует понимать, что эти модификации являются дополнением по меньшей мере к одной термически дестабилизирующей модификации дуплекса, присутствующего в антисмысловой цепи.

По меньшей мере на смысловой и антисмысловой цепях присутствуют по меньшей мере две различные модификации. Этими двумя модификациями могут быть модификации 2'-дезоксид, 2'-О-метил или 2'-фтор, ациклические нуклеотиды или другие. В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь и антисмысловая цепь, каждая, содержат два по-разному модифицированных нуклеотида, выбранных из 2'-О-метила или 2'-дезоксид. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый остаток смысловой цепи антисмысловой цепей независимо модифицирован 2'-О-метилнуклеотидом, 2'-дезоксинуклеотидом, 2'-дезоксид-2'-фторнуклеотидом, 2'-О-N-метилацетамидо (2'-О-NMA), нуклеотидом 2'-О-диметиламиноэтоксиэтил (2'-О-DMAEOE), нуклеотидом 2'-О-аминопропил (2'-О-AP) или нуклеотидом 2'-ага-F. Опять же, следует понимать, что эти модификации являются дополнением по меньшей мере к одной термически дестабилизирующей модификации дуплекса, присутствующего в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA по изобретению содержит модификации паттерна чередования, в частности, в областях B1, B2, B3, B1', B2', B3', B4'. Термин «чередующийся мотив» или «чередующийся паттерн», как используется в настоящем изобретении, относится к мотиву, имеющему одну или несколько модификаций, причем каждая модификация происходит на чередующейся нуклеотидной цепи. Чередующийся нуклеотид может относиться к одному на каждый второй нуклеотид или по одному на каждые три нуклеотида или к аналогичному шаблону. Например, если каждый из A, B и C представляет один тип модификации нуклеотида,

чередующийся мотив может представлять собой «ABABABABAB...», «AABBAABBAAB...», «AABAABAABAAB...», «AAABAABAABAAB...», «AAABBBAAABBB...» или «ABCABCABCABC...» и т. д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или различным. Например, если каждый из A, B, C, D представляет собой один тип модификации нуклеотида, чередующийся паттерн, то есть модификации каждого другого нуклеотида, может быть одинаковой, но каждая смысловая или антисмысловая цепь может быть выбрана из нескольких возможных модификаций в чередующемся мотиве, таких как «ABABAB...», «ACACAC...», «BDBDBD...» или «CDCDCD...» и т. д.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA по изобретению содержит паттерн модификации чередующегося мотива на смысловой цепи, который сдвинут относительно паттерна модификации чередующегося мотива на антисмысловой цепи. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой цепи соответствует другой модифицированной группе нуклеотидов антисмысловой цепи и наоборот. Например, при соединении смысловой цепи с антисмысловой цепью в дуплексе dsRNA чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «ABABAB» с 5' 3' цепи, а чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «BABABA» с 3'-5' цепи в области дуплекса. В качестве другого примера, чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «AABBAABV» с 5'-3'-конца цепи, а чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «VBAABVAA» с 3'-5'-конца цепи в дуплексной области, так что происходит полный или частичный сдвиг паттернов модификации между смысловой цепью и антисмысловой цепью.

Молекула dsRNA по изобретению дополнительно может содержать по меньшей мере одну фосфоротриатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Фосфоротриатная или метилфосфонатная модификацию межнуклеотидной связи может происходить на любом нуклеотиде смысловой цепи или антисмысловой цепи или обоих в любом положении цепи. Например, модификация межнуклеотидной связи может происходить на каждом нуклеотиде смысловой или антисмысловой цепи; каждая модификация межнуклеотидной связи может происходить в паттерне чередования на смысловой цепи или антисмысловой цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь содержит обе модификации межнуклеотидной связи в паттерне чередования. Паттерн чередования модификации межнуклеотидной связи на смысловой цепи может быть таким же или отличным от антисмысловой цепи, и паттерн чередования модификации межнуклеотидной связи на смысловой цепи может иметь сдвиг по сравнению с паттерном чередования модификации межнуклеотидной связи на антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA содержит фосфоротриатную или метилфосфонатную модификацию межнуклеотидной связи в области выступа. Например, область выступа содержит два нуклеотида, содержащих фосфоротриатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь между двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также можно проводить для

связывания выступающих нуклеотидов с концевыми спаренными нуклеотидами в дуплексной области. Например, по меньшей мере 2, 3, 4, или все выступающие нуклеотиды могут быть связанными посредством фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи, и, необязательно, могут присутствовать дополнительные фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, соединяющие выступающий нуклеотид со спаренным нуклеотидом, который является следующим после выступающего нуклеотида. Например, может существовать по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами, в которых два из трех нуклеотидов представляют собой выступающие нуклеотиды, и третий представляет собой спаренный нуклеотид, следующий после выступающего нуклеотида. Предпочтительно, эти концевые три нуклеотида могут находиться на 3'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь молекулы dsRNA содержит 1-10 блоков из двух-десяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности и указанная смысловая цепь спарена с антисмысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь молекулы dsRNA содержит два блока из двух фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь молекулы dsRNA содержит два блока из трех фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь молекулы dsRNA содержит два блока из четырех фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь молекулы dsRNA содержит два блока из пяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь молекулы dsRNA содержит два блока из шести фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь молекулы dsRNA содержит два блока из семи фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь молекулы dsRNA содержит два блока из восьми фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей

расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь молекулы dsRNA содержит два блока из девяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3 или 4 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA по изобретению дополнительно содержит одну или несколько фосфоротиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидной связи в пределах 1-10 положений конца смысловой или антисмысловой цепи. Например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов могут быть связаны фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью на одном или обоих концах смысловой или антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA по изобретению дополнительно содержит одну или несколько фосфоротиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидной связи в пределах 1-10 внутренней области дуплекса каждой смысловой или антисмысловой цепи. Например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотиды могут быть связаны фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью в положении 8-16 области дуплекса, считая от 5'-конца смысловой цепи; молекула dsRNA может, необязательно, дополнительно содержать одну или несколько фосфоротиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидной связи в пределах 1-10 концевых положений.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA по изобретению дополнительно содержит от одной до пяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидной связи(ей) в положениях 1-5 и от одной до пяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидной связи(ей) в положениях 18-23 смысловой цепи (считая от 5'-конца), и от одной до пяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и от одной до пяти в положениях 18-23 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA по изобретению дополнительно содержит одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положениях 1-5 и одну фосфоротиоатную или

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA по изобретению дополнительно содержит одну фосфоротиоатную модификацию

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA по изобретению дополнительно содержит одну фосфоротиаатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1, и одну фосфоротиаатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой цепи (считая от 5'-конца), и две

фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 20 и 21 антисмысловая цепь (считая от 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA по изобретению дополнительно содержит две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положении 1 и 2, и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положении 21 и 22 смысловой цепи (считая от 5'-конца), и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положениях 1 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA по изобретению дополнительно содержит одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1, и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой цепи (считая от 5'-конца), и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 21 и 22 антисмысловая цепь (считая от 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA по изобретению дополнительно содержит две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положении 1 и 2, и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положении 22 и 23 смысловой цепи (считая от 5'-конца), и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положениях 1 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA по изобретению дополнительно содержит одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1, и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой цепи (считая от 5'-конца), и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 23 и 23 антисмысловая цепь (считая от 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение по изобретению структуру хиральных центров скелета. В некоторых вариантах осуществления изобретения общая структура хиральных центров скелета содержит по меньшей мере 5 межнуклеотидных связей в конфигурации Sp. В некоторых вариантах осуществления изобретения общая структура хиральных центров скелета содержит по меньшей мере 6 межнуклеотидных связей в конфигурации Sp. В некоторых вариантах осуществления изобретения общая структура хиральных центров скелета содержит по меньшей мере 7 межнуклеотидных связей в конфигурации Sp. В некоторых вариантах осуществления изобретения общая структура хиральных центров скелета содержит по меньшей мере 8

[illegible]

[illegible]

В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение по изобретению содержит блок, представляющий собой стереохимический блок. В некоторых вариантах осуществления изобретения блок представляет собой блок Rp, в котором каждая межнуклеотидная связь блока представляет собой Rp. В некоторых вариантах осуществления изобретения 5'-блок представляет собой блок Rp. В некоторых вариантах осуществления изобретения 3'-блок представляет собой блок Rp. В некоторых вариантах осуществления изобретения блок представляет собой блок Sp в том смысле, что каждая межнуклеотидная связь блока представляет собой блок Sp. В некоторых вариантах осуществления изобретения 5'-блок представляет собой блок Sp. В некоторых вариантах осуществления изобретения 3'-блок представляет собой блок Sp. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложенные олигонуклеотиды содержат как блоки Rp, так и блоки Sp. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложенные олигонуклеотиды содержат один или несколько блоков Rp, но не содержат блоки Sp. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложенные олигонуклеотиды содержат один или несколько блоков Sp, но не содержат блоки Rp. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложенные олигонуклеотиды содержат один или несколько блоков PO, в которых каждая межнуклеотидная связь представляет собой природную фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение по изобретению содержит 5'-блок, представляющий собой блок Sp, где каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения 5'-блок представляет собой блок Sp, где каждая межнуклеотидная связь представляет собой модифицированную межнуклеотидную связь и каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения 5'-блок представляет собой блок Sp, где каждая межнуклеотидная связь представляет собой тифосфатную связь и каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения 5'-блок содержит 4 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления изобретения 5'-блок содержит 5 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления изобретения 5'-блок содержит 6 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления изобретения 5'-блок содержит 7 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления изобретения 3'-блок представляет собой блок Sp, где каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения 3'-блок представляет собой блок Sp, где каждая межнуклеотидная связь представляет собой модифицированную межнуклеотидную связь и каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения 3'-блок представляет собой блок Sp, где каждая межнуклеотидная связь представляет собой тифосфатную связь и каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F модификацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения 3'-блок содержит 4 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления изобретения 3'-блок содержит 5 или более

нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления изобретения 3'-блок содержит 6 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления изобретения 3'-блок содержит 7 или более нуклеозидных звеньев.

В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение по изобретению содержит тип нуклеозида в области или олигонуклеотид, за которым следует определенный тип межнуклеотидной связи, например, природная фосфатная связь, модифицированная межнуклеотидная связь, хиральная межнуклеотидная связь Rp, хиральная межнуклеотидная связь Sp и т. д. В некоторых вариантах осуществления изобретения за A следует Sp. В некоторых вариантах осуществления изобретения за A следует Rp. В некоторых вариантах осуществления изобретения за A следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления изобретения за U следует Sp. В некоторых вариантах осуществления изобретения за U следует Rp. В некоторых вариантах осуществления изобретения за U следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления изобретения за C следует Sp. В некоторых вариантах осуществления изобретения за C следует Rp. В некоторых вариантах осуществления изобретения за C следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления изобретения за G следует Sp. В некоторых вариантах осуществления изобретения за G следует Rp. В некоторых вариантах осуществления изобретения за G следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления изобретения за C и U следует Sp. В некоторых вариантах осуществления изобретения за C и U следует Rp. В некоторых вариантах осуществления изобретения за C и U следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления изобретения за A и G следует Sp. В некоторых вариантах осуществления изобретения за A и G следует Rp.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь содержит фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 21 и 22 и между положениями нуклеотидов 22 и 23, где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну термодестабилизирующую модификацию дуплекса, расположенную в участке узнавания мишени антисмысловой цепи (то есть в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи), и где dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловой фрагмент содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловой фрагмент содержит 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с линкером; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок из 12-40 пар нуклеотидов; и (viii) dsRNA имеет тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь содержит фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22 и между

положениями нуклеотидов 22 и 23, где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну термодестабилизирующую модификацию дуплекса, расположенную в участке узнавания мишени антисмысловой цепи (то есть в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи), и где dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловой фрагмент содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) смысловая цепь конъюгирована с линкером; (iii) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (iv) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (v) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vi) dsRNA содержит дуплексный участок из 12-40 пар нуклеотидов; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок из 12-40 пар нуклеотидов; и (viii) dsRNA имеет тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь содержит фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2 и между положениями нуклеотидов 2 и 3, где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну термодестабилизирующую модификацию дуплекса, расположенную в участке узнавания мишени антисмысловой цепи (то есть в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи), и где dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловой фрагмент содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловой фрагмент содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с линкером; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок из 12-40 пар нуклеотидов; и (viii) dsRNA имеет тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь содержит фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2 и между положениями нуклеотидов 2 и 3, антисмысловая цепь содержит фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22 и между положениями нуклеотидов 22 и 23, где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну термодестабилизирующую модификацию дуплекса, расположенную в участке узнавания мишени антисмысловой цепи (то есть в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи), и где dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловой фрагмент содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) смысловая цепь конъюгирована с линкером; (iii) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (iv) смысловая цепь содержит 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (v) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-

модификации; (vi) dsRNA содержит дуплексный участок из 12-40 пар нуклеотидов; и (vii) dsRNA имеет тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA по изобретению содержит ошибочное спаривание(ия) с мишенью, внутри дуплекса или их комбинации. Ошибочное спаривание может встречаться в области выступа или в области дуплекса. Пара оснований можно ранжировать на основе их склонности способствовать диссоциации или плавлению (например, по свободной энергии ассоциации или диссоциации конкретной пары, самый простой подход - исследовать пары на основе отдельной пары, хотя следующий сосед или аналогичный анализ также может быть использован). С точки зрения стимуляции диссоциации: A:U предпочтительнее G:C; G:U предпочтительнее G:C; и I:C предпочтительнее G:C (I=инозин). Ошибочные спаривания, например, неканонические или отличные от канонических пары (как описано в другом месте в настоящем документе), предпочтительнее канонических (A:T, A:U, G:C) пар; и пары, которые включают универсальное основание, предпочтительнее канонических пар.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA по изобретению содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в пределах дуплексных областей от 5'-конца антисмысловой цепи, которые могут быть независимо выбраны из группы, включающей: A:U, G:U, I:C, и пары ошибочных спариваний, например, неканонические или отличные от канонических пары или пары, которые включают универсальное основание, чтобы способствовать диссоциации антисмыслового цепь на 5'-конце дуплекса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотид в положении 1 в области дуплекса от 5'-конца антисмысловой цепи выбран из группы, включающей, dA, dU, U и dT. Альтернативно, по меньшей мере одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований в области дуплекса от 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU. Например, первая пара оснований в области дуплекса от 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU.

Было обнаружено, что введение 4'-модифицированного или 5'-модифицированного нуклеотида на 3'-конец фосфодиэфирной (PO), фосфоротиоатной (PS) или фосфородитиоатной (PS2) связи динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двойной многоцепочечный олигонуклеотид может оказывать стерическое действие на межнуклеотидную связь и, следовательно, защищать или стабилизировать ее от нуклеаз.

В некоторых вариантах осуществления изобретения 5'-модифицированный нуклеозид вводят на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной siRNA. Например, 5'-алкилированный нуклеозид может быть введен на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной siRNA. Алкильная группа в 5'-положении рибозного сахара может быть рацемическим или хирально чистым *R* или *S* изомером. Типичным 5'-алкилированным нуклеозидом является 5'-метилнуклеозид. 5'-метил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым *R* или *S* изомером.

В некоторых вариантах осуществления изобретения 4'-модифицированный нуклеозид вводят на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной siRNA. Например, 4'-алкилированный нуклеозид может быть введен на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной siRNA. Алкильная группа в положении 4' рибозного сахара может быть рацемическим или хирально чистым *R* или *S* изомером. Типичным 4'-алкилированным нуклеозидом является 4'-метилнуклеозид. 4'-метил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым *R* или *S* изомером. Альтернативно, 4'-*O*-алкилированный нуклеозид может быть введен на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной siRNA. 4'-*O*-алкил сахара рибозы может быть рацемическим или хирально чистым *R* или *S* изомером. Примером 4'-*O*-алкилированного нуклеозида является 4'-*O*-метил нуклеозид. 4'-*O*-метил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым *R* или *S* изомером.

В некоторых вариантах осуществления изобретения 5'-алкилированный нуклеозид вводят в любое положение смысловой или антисмысловой цепи dsRNA, и такая модификация поддерживает или улучшает эффективность dsRNA. 5'-алкил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым *R* или *S* изомером. Примером 5'-алкилированного нуклеозида является 5'-метил нуклеозид. 5'-метил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым *R* или *S* изомером.

В некоторых вариантах осуществления изобретения 4'-алкилированный нуклеозид вводят в любое положение смысловой или антисмысловой цепи dsRNA, и такая модификация поддерживает или улучшает эффективность dsRNA. 4'-алкил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым *R* или *S* изомером. Примером 4'-алкилированного нуклеозида является 4'-метил нуклеозид. 4'-метил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым *R* или *S* изомером.

В некоторых вариантах осуществления изобретения 4'-*O*-алкилированный нуклеозид вводят в любое положение смысловой или антисмысловой цепи dsRNA, и такая модификация поддерживает или улучшает эффективность dsRNA. 5'-алкил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым *R* или *S* изомером. Примером 4'-*O*-алкилированного нуклеозида является 4'-*O*-метил нуклеозид. 4'-*O*-метил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым *R* или *S* изомером.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула dsRNA по изобретению может содержать 2'-5' связи (с 2'-H, 2'-ОН и 2'-ОМе и с Р=О или Р=S). Например, модификации 2'-5'-связей можно использовать для повышения устойчивости к нуклеазам или для ингибирования связывания смысловой цепи с антисмысловой цепью, или их можно использовать на 5'-конце смысловой цепи, чтобы избежать активации смысловой цепи с помощью RISC.

В другом варианте осуществления изобретения молекула dsRNA по изобретению может содержать L-сахара (например, L-рибозу, L-арабинозу с 2'-H, 2'-ОН и 2'-ОМе). Например, эти модификации L-сахаров можно использовать для повышения устойчивости к нуклеазам или для ингибирования связывания смысловой цепи с антисмысловой цепью,

или их можно использовать на 5'-конце смысловой цепи, чтобы избежать активации смысловой цепи с помощью RISC.

В различных публикациях описываются мультимерные siRNA, которые все можно использовать с dsRNA по изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, US 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 и WO2011/031520, которые настоящим полностью включены в настоящий документ.

Как более подробно описано ниже, агент RNAi, который содержит конъюгации одного или нескольких углеводных фрагментов с агентом RNAi, может оптимизировать одно или несколько свойств агента RNAi. Во многих случаях углеводный фрагмент будет присоединен к модифицированной субъединице агента RNAi. Например, рибозный сахар одной или нескольких рибонуклеотидных субъединиц агента dsRNA может быть заменен другим фрагментом, например, неуглеводным (предпочтительно циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный лиганд. Субъединица рибонуклеотида, в которой таким образом заменен сахар рибозы субъединицы, упоминается в настоящем документе как субъединица модификации замены рибозы (RRMS). Циклический носитель может представлять собой карбоциклическую кольцевую систему, то есть все атомы кольца представляют собой атомы углерода, или гетероциклическую кольцевую систему, то есть один или несколько кольцевых атомов могут представлять собой гетероатом, например, азот, кислород, серу. Циклический носитель может представлять собой моноциклическую систему колец или может содержать два или более колец, например конденсированные кольца. Циклический носитель может представлять собой полностью насыщенную кольцевую систему или может содержать одну или несколько двойных связей.

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

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

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент RNAi для применения в способах по изобретению представляет собой агент, выбранный из группы агентов, перечисленных в любой из таблиц 2-5 и 7-10. Эти агенты могут дополнительно содержать лиганд, такой как один или несколько липофильных фрагментов, одно или несколько производных GalNAc или оба из одного или нескольких липофильных фрагментов и одного или нескольких производных GalNAc.

IV. iRNA, конъюгированные с лигандами

Другая модификация RNA iRNA по изобретению включает химическое связывание с iRNA одного или нескольких лигандов, фрагментов или конъюгатов, которые усиливают активность, клеточное распределение или клеточное поглощение iRNA, например, в клетку. Такие фрагменты включают, но не ограничиваются ими, липидные фрагменты, такие как холестеринный фрагмент (Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556), холевую кислоту (Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053-1060), тиоэфир, например, берил-*S*-третилтиол (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765-2770), тиохолестерол (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538), алифатическую цепь, например, додекандиоловые или ундецильные остатки (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J*, 1991, 10:1111-1118; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327-330; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49-54), фосфолипид, например, ди-гексадецил-гас-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-О-гексадецил-гас-глицеро-3-фосфонат (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777-3783), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973), или адамантануксусная кислота (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), пальмитильный фрагмент (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237) или октадециламиновый или гексиламинокарбонилхлестериновый фрагмент (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд изменяет распределение, нацеливание или время жизни агента iRNA, в который он включен. В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд обеспечивает повышенную аффинность к выбранной мишени, например, молекуле, клетке или типу клеток, компартменту, например, клеточному или органному компартменту, ткани, органу или области тела, как, например, по сравнению с видами, у которых такой лиганд отсутствует.

Типичные лиганды не будут участвовать в спаривании дуплексов в дуплексной нуклеиновой кислоте.

Лиганды могут включать природное вещество, такое как белок (например, человеческий сывороточный альбумин (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновая кислота); или липид. Лиганд также может быть рекомбинантной или синтетической молекулой, такой как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминокислота. Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, представляющую собой полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола и малеинового ангидрида, сополимер поли(L-лактида и гликоля), сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламида (НМРА), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), полимеры N-изопропилакриламида или полифосфазин. Примеры полиаминов включают: полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметический полиамин, дендримерный полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или α -спиральную пептид.

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

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие агенты (например, акридины), сшивающие агенты (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, ЭДТА), липофильные молекулы, например, холестерин, холевая кислота, адамантануксусная кислота, 1-пиренмасляная кислота, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилосигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеил)литохолевую кислоту, ОЗ-(олеил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин) и пептидные конъюгаты (например, пептид

антеннопедия, пептид Tat), алкилирующие агенты, фосфат, аминокислоты, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, полиамино, алкил, замещенный алкил, радиоактивно меченый маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), средства, способствующие транспорту/абсорбции (например, аспирин, витамин Е, фолиевая кислота), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, кластеры имидазола, конъюгаты акридин-имидазола, Eu³⁺ комплексы тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или АП.

Лиганды могут быть белками, например, гликопротеинами, или пептидами, например, молекулами, обладающими специфическим сродством к ко-лиганду, или антителами, например, антителом, которое связывается с определенным типом клеток, таким как клетка мозга или глиальная клетка. Лиганды могут также включать гормоны и гормональные рецепторы. Они также могут включать непептидные соединения, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу или поливалентную фукозу. Лиганд может представлять собой, например, липополисахарид, активатор киназы p38 MAP или активатор NF-κB.

Лиганд может быть веществом, например, лекарственным средством, которое может увеличить поглощение агента iRNA клеткой, например, путем разрушения цитоскелета клетки, например, путем разрушения клеточных микротрубочек, микрофиламентов или промежуточных филаментов. Лекарственным средством может быть, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, джаплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинголид А, инданоцин или миосервин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд, присоединенный к iRNA, как описано в настоящем документе, действует как фармакокинетический модулятор (модулятор фармакокинетики). Модуляторы РК включают липофилы, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, агенты, связывающие белки, PEG, витамины и т. д. Примеры модуляторов РК включают, но этим не ограничиваются, холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицериды, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т. д. Также известно, что олигонуклеотиды, содержащие ряд фосфоротиоатных связей, связываются с белком сыворотки, поэтому короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды примерно из 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие несколько фосфоротиоатных связей в остоле, также применимы в настоящем изобретении. Кроме того, аптамеры, которые связывают компоненты сыворотки (например, белки сыворотки), также подходят для применения в качестве лигандов, модулирующих РК, в вариантах осуществления, описанных в настоящем документе.

Лиганд-конъюгированные iRNA по изобретению могут быть синтезированы с использованием олигонуклеотида, который несет побочную реактивную функциональность, например, полученную в результате присоединения связывающей молекулы к олигонуклеотиду (описано ниже). Этот реакционноспособный олигонуклеотид

может вступать в реакцию непосредственно с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезированы с любой из множества защитных групп, или лигандами, к которым присоединен связывающий фрагмент.

Олигонуклеотиды, используемые в конъюгатах по настоящему изобретению, могут быть легко и рутинно получены с помощью хорошо известного метода твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза продается несколькими поставщиками, включая, например, Applied Biosystems® (Foster City, Calif.). Дополнительно или альтернативно можно использовать любые другие способы такого синтеза, известные в данной области техники. Также известно использование аналогичных методов для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфоротиоаты и алкилированные производные.

В олигонуклеотидах, конъюгированных с лигандом, и нуклеозидах, несущих связанную последовательность-специфическую молекулу лиганда по настоящему изобретению, олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем DNA-синтезаторе, использующем стандартные предшественники нуклеотидов или нуклеозидов, или предшественники нуклеотидов или нуклеозидных конъюгатов, которые уже несут связывающий фрагмент, предшественники конъюгата лиганд-нуклеотид или нуклеозид-конъюгат, которые уже несут молекулу лиганда, или строительные блоки, не содержащие нуклеозидный лиганд.

При использовании предшественников нуклеотидных конъюгатов, которые уже несут связывающий фрагмент, синтез связанных нуклеозидов, специфичных для последовательности, обычно завершается, и затем молекула лиганда реагирует со связывающим фрагментом с образованием олигонуклеотида, конъюгированного с лигандом. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды или связанные нуклеозиды по настоящему изобретению синтезируют с помощью автоматического синтезатора с использованием фосфорамидитов, полученных из конъюгатов лиганд-нуклеозид, в дополнение к стандартным фосфорамидитам и нестандартным фосфорамидитам, которые имеются в продаже и обычно используются в синтезе олигонуклеотидов.

А. Липидные конъюгаты

В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд или конъюгат представляет собой липид или молекулу на основе липида. Такой липид или молекула на основе липида обычно может связываться с сывороточным белком, таким как сывороточный альбумин человека (HSA). Лиганд, связывающий HSA, позволяет распределять конъюгат в ткани-мишени, например, в ткани-мишени, отличной от почки. Например, тканью-мишенью может быть печень, включая паренхиматозные клетки печени. В качестве лигандов также могут быть использованы другие молекулы, которые могут связывать HSA. Например, можно использовать напроксен или аспирин. Липид или лиганд на основе липида может (а) повышать устойчивость конъюгата к деградации, (b) усиливать нацеливание или транспорт в клетку-мишень или клеточную мембрану или (с) может быть использован для регулирования связывания с белком сыворотки, например, HSA.

Лиганд на основе липида может быть использован для модулирования, например, контроля (например, ингибирования) связывания конъюгата с тканью-мишенью. Например, липид или лиганд на основе липида, который сильнее связывается с HSA, с меньшей вероятностью будет нацелен на почки и, следовательно, с меньшей вероятностью будет выведен из организма. Липид или лиганд на основе липида, который менее сильно связывается с HSA, может быть использован для нацеливания конъюгата на почки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд на основе липида связывает HSA. Например, лиганд может связывать HSA с достаточной аффинностью, так что распределение конъюгата в ткани, не относящейся к почкам, усиливается. Однако аффинность обычно не настолько сильна, чтобы невозможно было обратить связывание HSA-лиганда.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд на основе липида слабо связывает HSA или вообще не связывает его, так что распределение конъюгата в почках усиливается. Вместо лиганда на липидной основе или в дополнение к нему можно использовать и другие фрагменты, нацеленные на клетки почек.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд на основе липида связывает HSA. Например, лиганд может связывать HSA с достаточной аффинностью, так что распределение конъюгата в ткани, не относящейся к почкам, усиливается. Однако аффинность обычно не настолько сильна, чтобы невозможно было обратить связывание HSA-лиганда.

В другом аспекте лиганд представляет собой фрагмент, например, витамин, который поглощается клеткой-мишенью, например, пролиферирующей клеткой. Они особенно полезны для лечения нарушений, характеризующихся нежелательной клеточной пролиферацией, например, злокачественного или незлокачественного типа, например, раковых клеток. Типичные витамины включают витамин А, Е и К. Другие иллюстративные витамины включают витамин В, например, фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль или другие витамины или питательные вещества, поглощаемые раковыми клетками. Также включены HSA и липопротеины низкой плотности (LDL).

В. Агенты проникновения в клетки

В другом аспекте лиганд представляет собой агент для проникновения в клетку, такой как спиральный агент для проникновения в клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения агент является амфипатическим. Примером агента является пептид, такой как tat или антенопептид. Если агент представляет собой пептид, его можно модифицировать, включая пептидилмиметик, инвертомеры, непептидные или псевдопептидные связи и использование D-аминокислот. Спиральный агент обычно представляет собой α -спиральный агент и может иметь липофильную и липофобную фазы.

Лиганд может представлять собой пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в настоящем документе олигопептидомиметиком) представляет собой молекулу, способную складываться в определенную трехмерную структуру, подобную природному пептиду. Присоединение пептидов и пептидомиметиков к агентам iRNA может

влиять на фармакокинетическое распределение iRNA, например, за счет усиления клеточного распознавания и абсорбции. Пептид или пептидомиметический фрагмент может иметь длину примерно 5-50 аминокислот, например, примерно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

Пептид или пептидомиметик может быть, например, проникающим в клетку пептидом, катионным пептидом, амфипатическим пептидом или гидрофобным пептидом (например, состоящим в основном из Tyr, Trp или Phe). Пептидная часть может представлять собой дендримерный пептид, ограниченный пептид или сшитый пептид. В другом варианте пептидный фрагмент может включать транслокационную последовательность гидрофобной мембраны (MTS). Примером гидрофобного MTS-содержащего пептида является RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO:11). Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO:12)), содержащий гидрофобную MTS, также может быть нацеливающим фрагментом. Пептидная часть может быть пептидом «доставки», который может переносить большие полярные молекулы, включая пептиды, олигонуклеотиды и белок, через клеточные мембраны. Например, было обнаружено, что последовательности белка Tat HIV (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO:13)) и белка *Drosophila Antennapedia* (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:14)) способны функционировать в качестве пептидов доставки. Пептид или пептидомиметик может кодироваться случайной последовательностью DNA, такой как пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея или комбинаторной библиотеки «одна бусина - одно соединение» (OBOC) (Lam *et al.*, *Nature*, 354:82-84, 1991). Обычно, пептид или пептидомиметик, присоединенный к агенту dsRNA через встроенную мономерную единицу, представляет собой пептид, нацеленный на клетку, такой как пептид аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD) или имитатор RGD. Длина пептидной части может варьироваться от около 5 аминокислот до около 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут иметь структурную модификацию, например, для повышения стабильности или непосредственных конформационных свойств. Может быть использована любая из структурных модификаций, описанных ниже.

Пептид RGD для применения в композициях и способах по изобретению может быть линейным или циклическим и может быть модифицирован, например, гликозилирован или метилирован, для облегчения нацеливания на конкретную ткань(и). RGD-содержащие пептиды и пептидомиметики могут включать D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD можно использовать другие фрагменты, нацеленные на интегриновый лиганд. Предпочтительные конъюгаты этого лиганда нацелены на PECAM-1 или VEGF.

Пептидный фрагмент RGD можно использовать для нацеливания на конкретный тип клеток, например, на опухолевые клетки, такие как эндотелиальные опухолевые клетки или опухолевые клетки рака молочной железы (Zitzmann *et al.*, *Cancer Res.*, 62:5139-43, 2002). Пептид RGD может способствовать нацеливанию агента dsRNA на опухоли множества

других тканей, включая легкие, почки, селезенку или печень (Aoki *et al.*, *Cancer Gene Therapy* 8:783-787, 2001). Обычно, пептид RGD будет способствовать нацеливанию агента iRNA на почки. Пептид RGD может быть линейным или циклическим и может быть модифицирован, например, гликозилирован или метилирован для облегчения нацеливания на определенные ткани. Например, гликозилированный пептид RGD может доставлять средство iRNA к опухолевой клетке, экспрессирующей $\alpha_v\beta_3$ (Haubner *et al.*, *Jour. Nucl. Med.*, 42:326-336, 2001).

«Проникающий в клетку пептид» способен проникать в клетку, например, в микробную клетку, такую как бактериальная или грибковая клетка, или в клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Пептид, проникающий в микробную клетку, может представлять собой, например, α -спиральный линейный пептид (например, LL-37 или Secorin P1), пептид, содержащий дисульфидную связь (например, α -дефенсин, β -дефенсин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две доминирующие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Проникающий в клетку пептид может также включать сигнал ядерной локализации (NLS). Например, проникающий в клетку пептид может представлять собой двухкомпонентный амфипатический пептид, такой как MPG, который получен из домена слитого пептида gp41 HIV-1 и NLS большого Т-антигена SV40 (Simeoni *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 31:2717-2724, 2003).

С. Углеводные конъюгаты

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиций и способов по изобретению iRNA дополнительно содержит углеводов. iRNA, конъюгированные с углеводами, являются удобными для доставки нуклеиновых кислот *in vivo*, а также композиций, подходящих для терапевтического применения *in vivo*, как описано в настоящем документе. Как используется в настоящем изобретении, «углевод» относится к соединению, которое само по себе является углеводом, состоящим из одного или нескольких моносахаридных звеньев, содержащих по меньшей мере 6 атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода; или соединению, в состав которого входит углеводный фрагмент, состоящий из одной или нескольких моносахаридных единиц, каждая из которых имеет по меньшей мере шесть атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Типичные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие примерно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных звеньев) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные камеди. Конкретные моносахариды включают сахара C5 и выше (например, C5, C6, C7 или C8); ди- и трисахариды включают сахара, имеющие две или три моносахаридные единицы (например, C5, C6, C7 или C8).

В некоторых вариантах осуществления изобретения а углеводный конъюгат содержит моносахарид.

В некоторых вариантах осуществления изобретения моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин (GalNAc). Конъюгаты GalNAc, которые содержат одно или ряд производных N-ацетилгалактозамина (GalNAc), описаны, например, в патенте США № 8106022, полное содержание которого включено сюда в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат GalNAc служит лигандом, который направляет iRNA к определенным клеткам. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат GalNAc нацеливает iRNA на клетки печени, например, выступая в качестве лиганда для асиалогликопротеинового рецептора клеток печени (например, гепатоцитов).

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

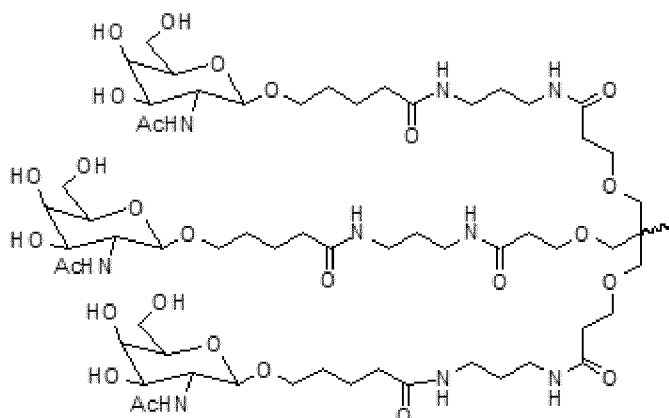
В некоторых вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к агенту iRNA по изобретению через одновалентный линкер. В некоторых вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к агенту iRNA по изобретению через двухвалентный линкер. Еще в других вариантах осуществления изобретения по изобретению, GalNAc или производное GalNAc присоединены к агенту iRNA по изобретению через трехвалентный линкер. В других вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к агенту iRNA по изобретению через четырехвалентный линкер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi по изобретению содержат один GalNAc или производное GalNAc, присоединенные к агенту iRNA. В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi по изобретению содержат ряд (например, 2, 3, 4, 5 или 6) GalNAc или производных GalNAc, независимо присоединенных к ряду нуклеотидов агента двухцепочечной RNAi через ряд одновалентных линкеров.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, например, когда две цепи агента iRNA по изобретению являются частью одной большей молекулы, соединенной непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образуя шпильку, содержащую ряд неспаренных нуклеотидов, каждый неспаренный нуклеотид в петле шпильки может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенные через одновалентный

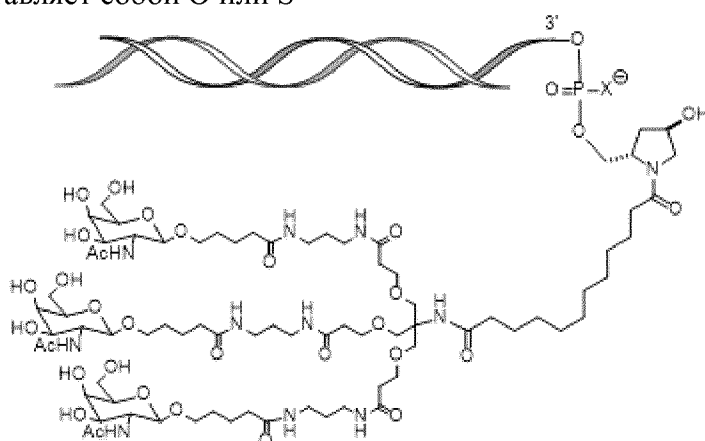
линкер. Петля-шпилька также может быть образована удлиненным выступом в одной цепи дуплекса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат GalNAc представляет собой

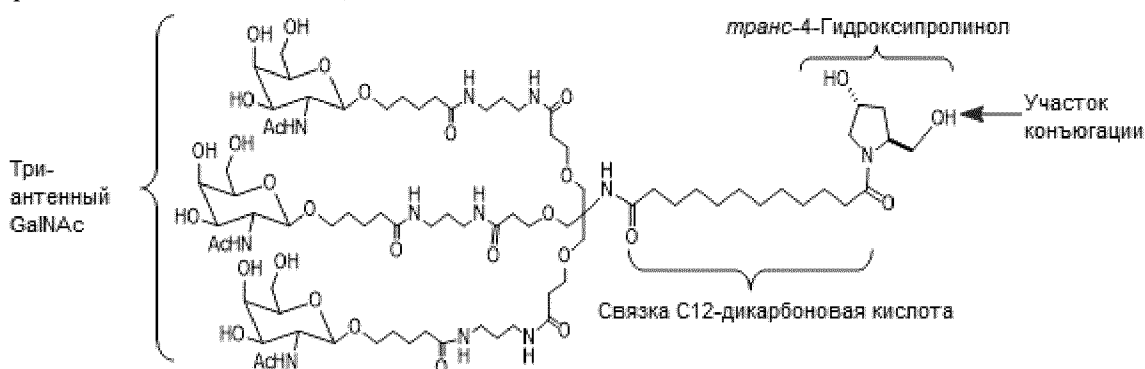


Формула II.

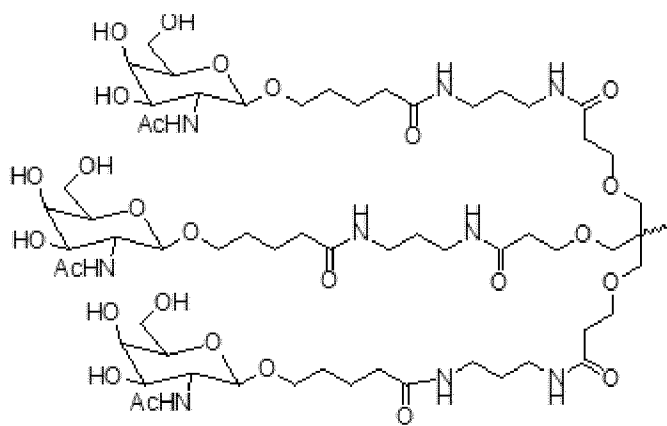
В некоторых вариантах осуществления изобретения агент RNAi присоединен к углеводному конъюгату через линкер, как показано на следующей схеме, где X представляет собой O или S



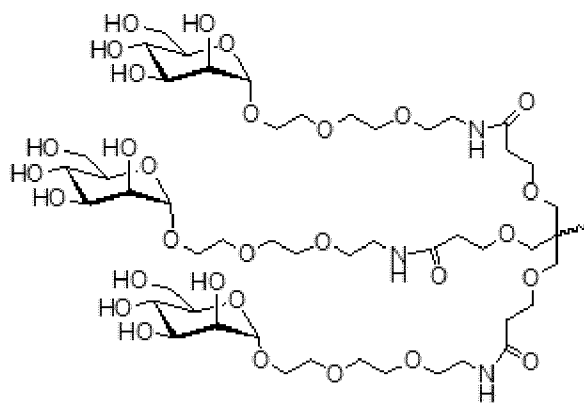
В некоторых вариантах осуществления изобретения агент RNAi конъюгирован с L96, определенным в таблице 1, и показан ниже:



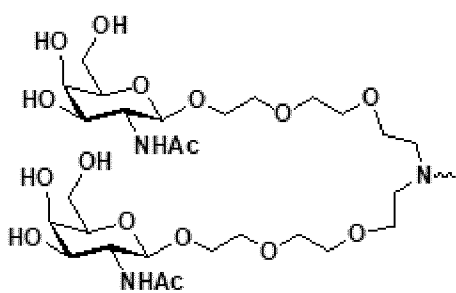
В некоторых вариантах осуществления изобретения а углеводный конъюгат для применения в композициях и способах по изобретению выбран из группы, включающей:



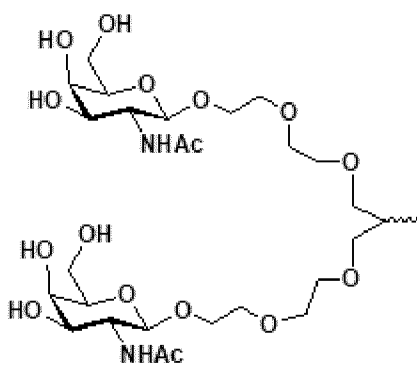
Формула II,



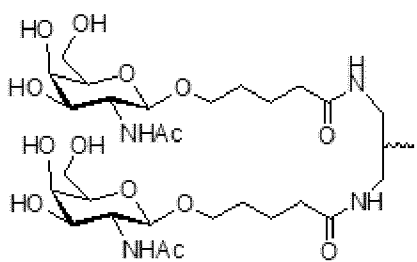
Формула III,



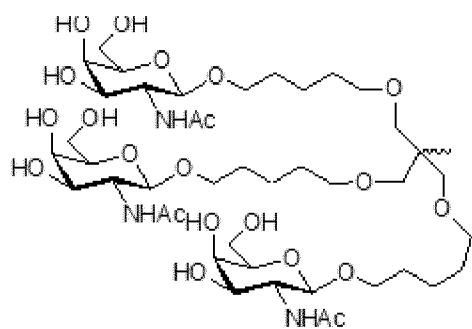
Формула IV,



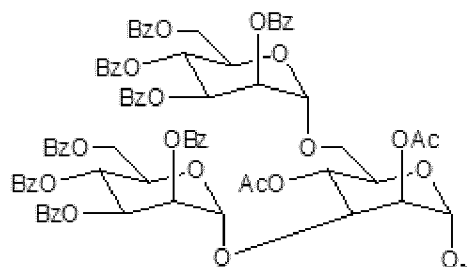
Формула V,



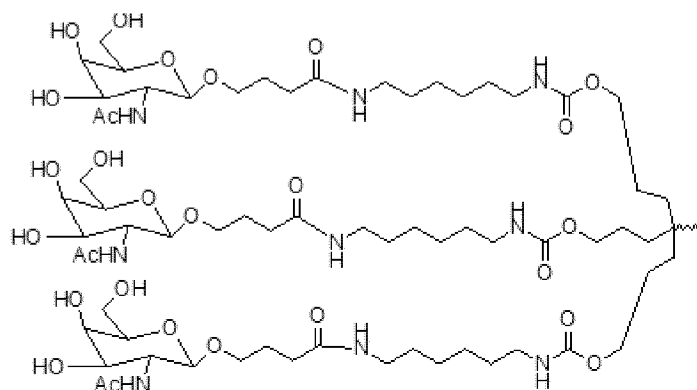
Формула VI,



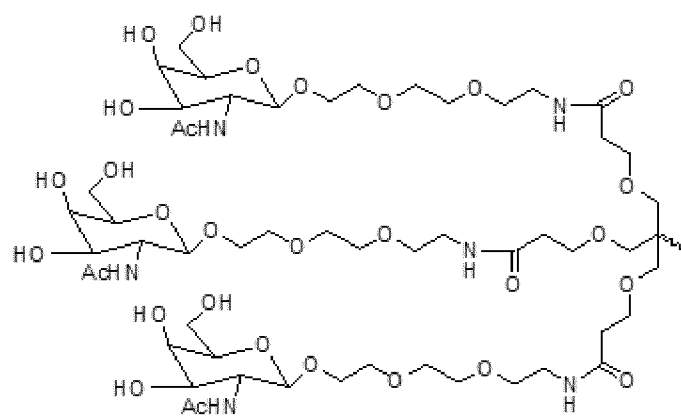
Формула VII,



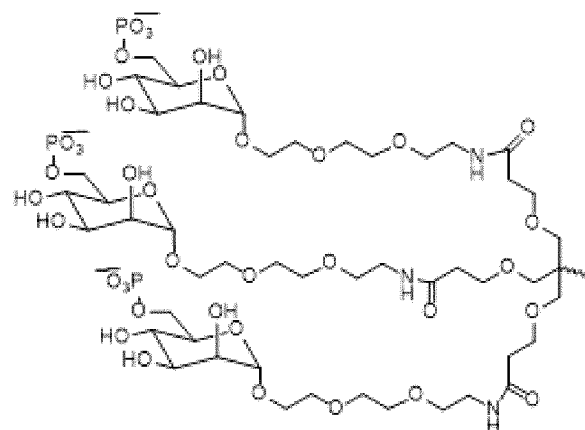
Формула VIII,



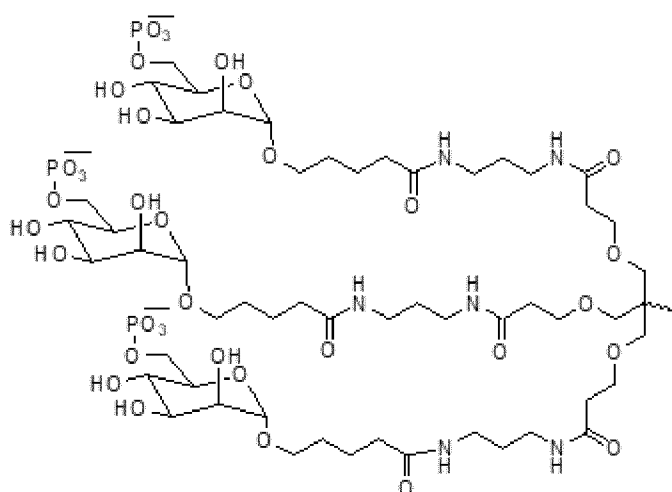
Формула IX,



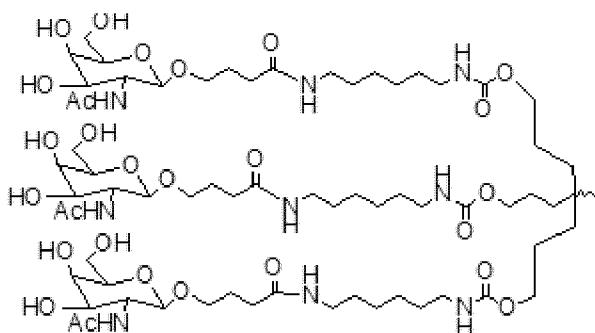
Формула X,



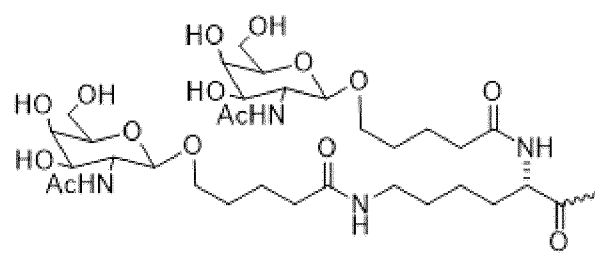
Формула XI,



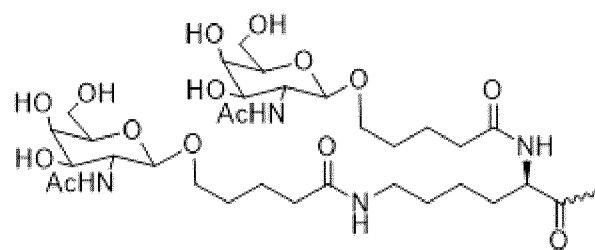
Формула XII,



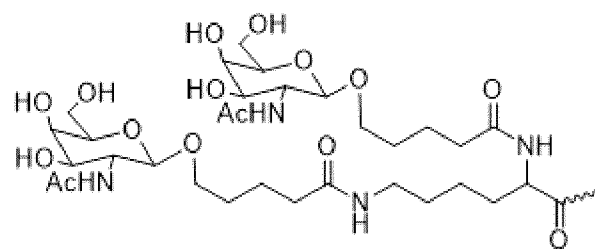
Формула XIII,



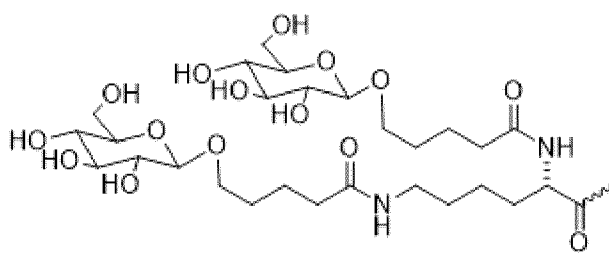
Формула XIV,



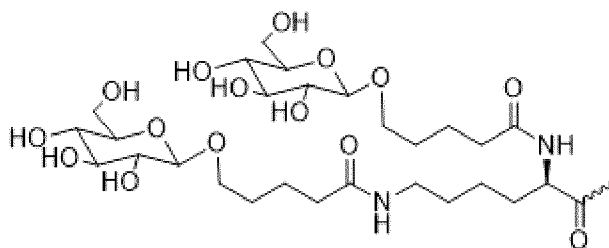
Формула XV,



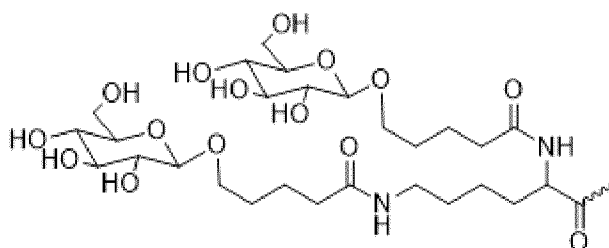
Формула XVI,



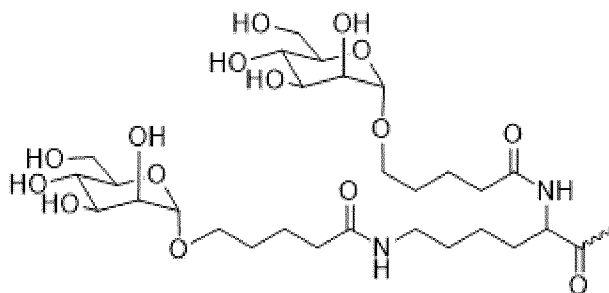
Формула XVII,



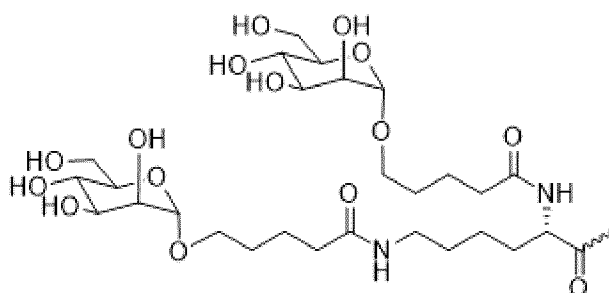
Формула XVIII,



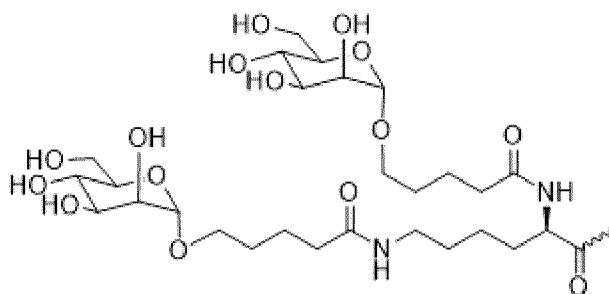
Формула XIX,



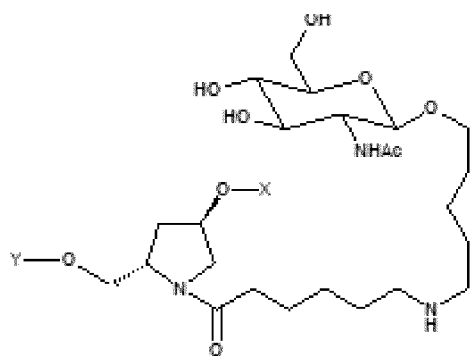
Формула XX,



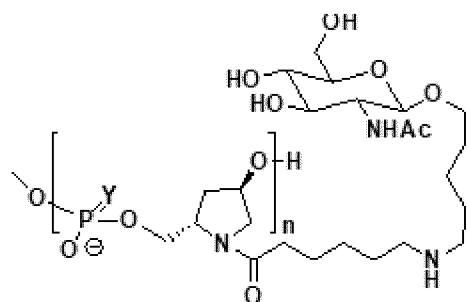
Формула XXI,



Формула XXII,

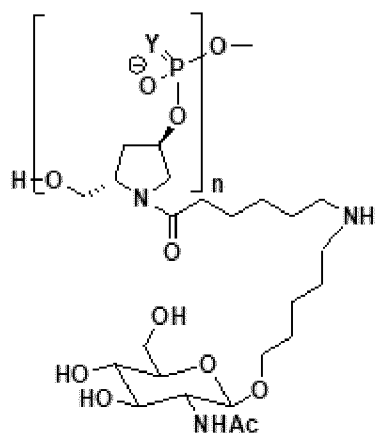


Формула XXIII,



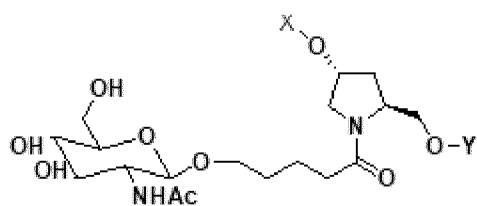
, где Y представляет собой O или S и n обозначает

3-6 (Формула XXIV);

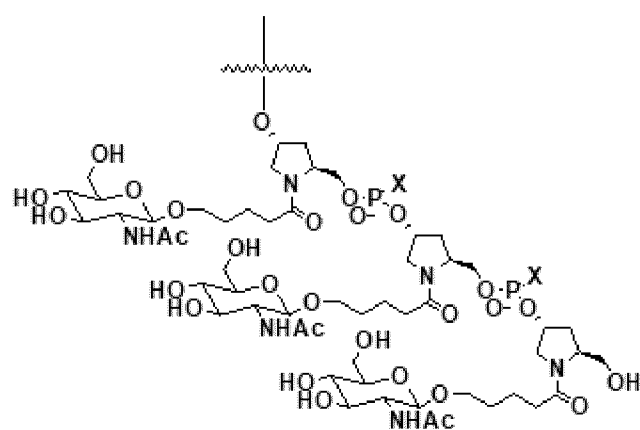


, где Y представляет собой O или S и n обозначает 3-6

(Формула XXV),

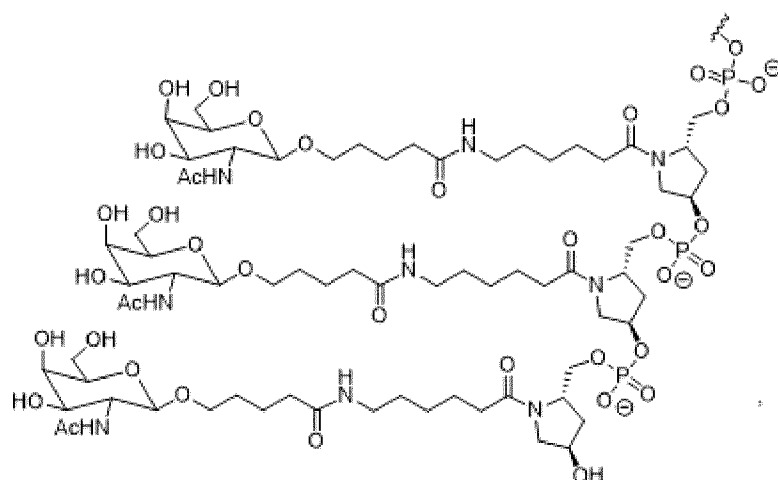


Формула XXVI,

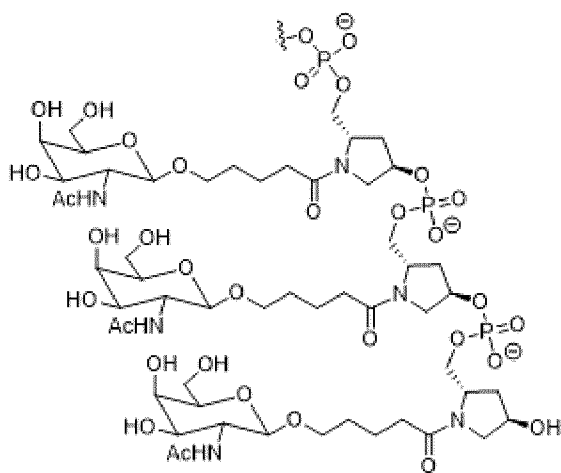


, где X представляет собой O или S

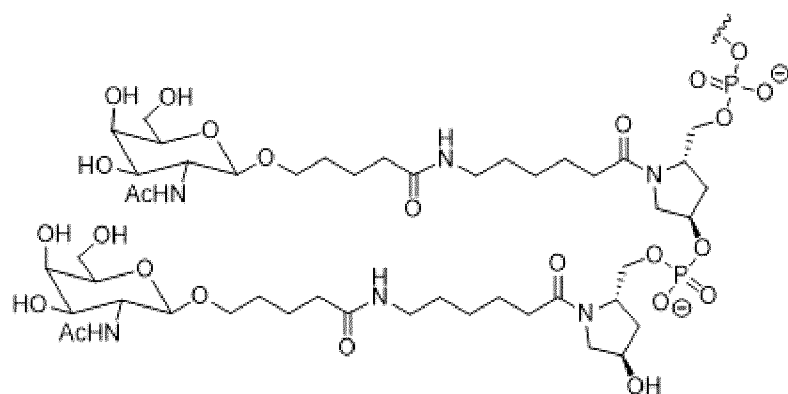
(Формула XXVII),



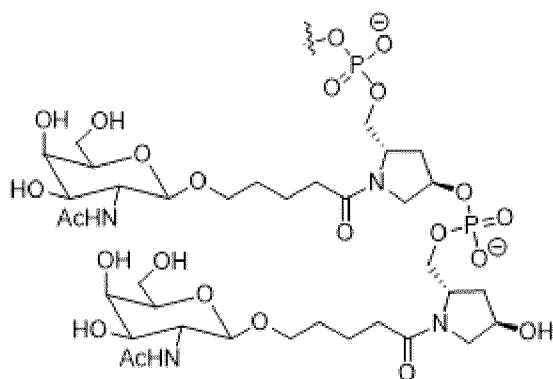
Формула XXVIII,



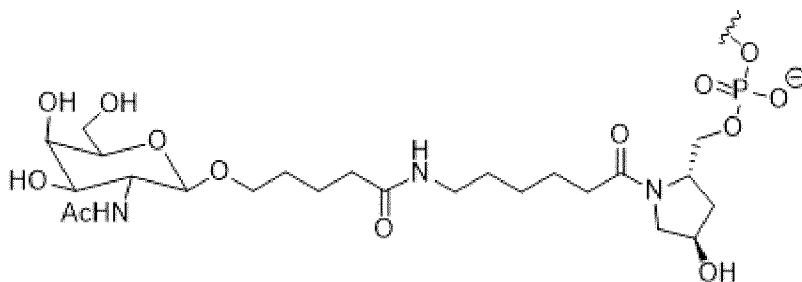
Формула XXIX,



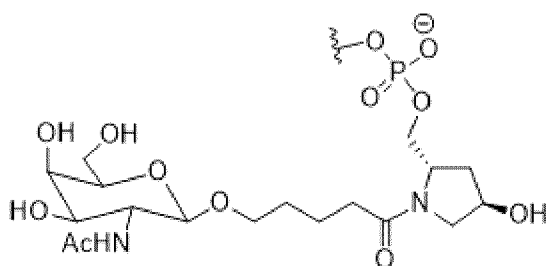
Формула XXX,



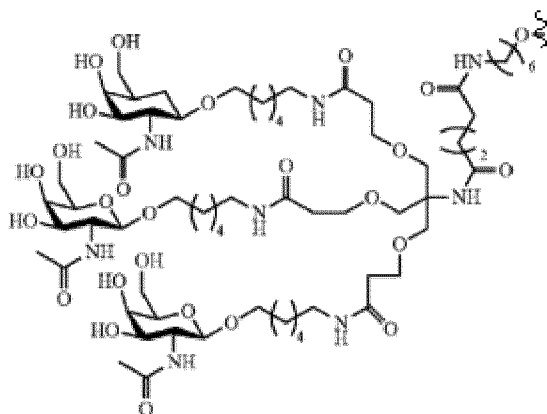
Формула XXXI,



Формула XXXII,

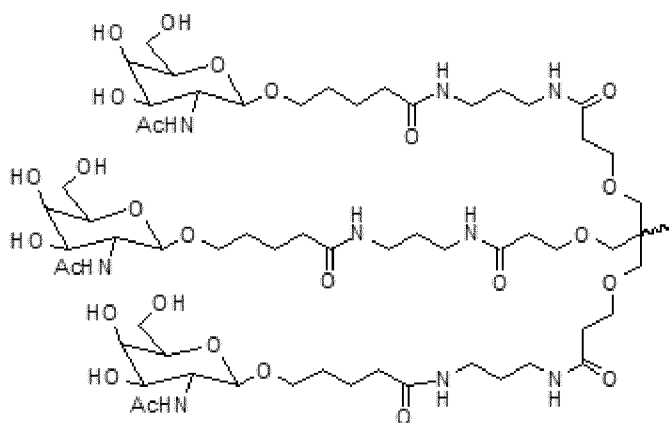


Формула XXXIII,



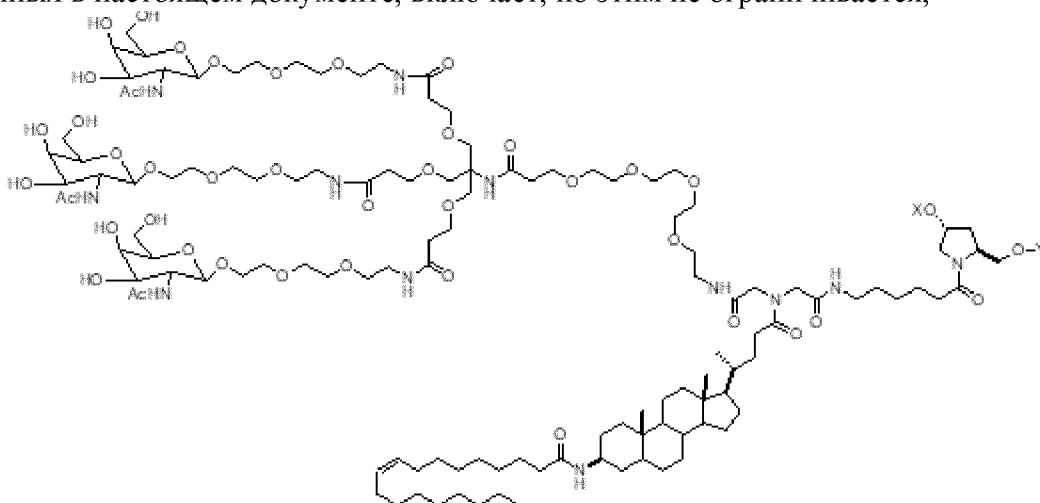
Формула XXXIV.

В некоторых вариантах осуществления изобретения углеводный конъюгат для применения в композициях и способах по изобретению представляет собой моносахарид. В некоторых вариантах осуществления изобретения моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин, такой как



Формула II.

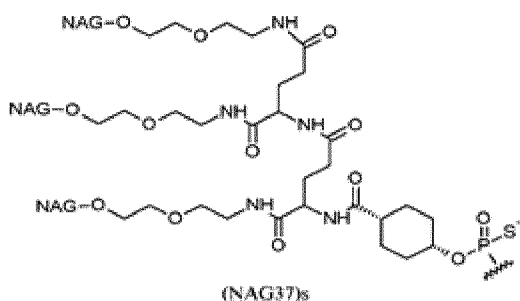
Другой пример углеводного конъюгата для применения в вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, включает, но этим не ограничивается,



(Формула XXXVI),

когда один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления изобретения подходящий лиганд представляет собой лиганд, описанный в WO 2019/055633, полное содержание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки. В одном варианте осуществления изобретения лиганд имеет следующую структуру:



В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты RNAi по изобретению могут включать лиганды GalNAc, даже если такие лиганды GalNAc, как предполагается, в настоящее время имеют ограниченное значение для предпочтительного пути(путей) интратекальной/ЦНС доставки согласно настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к агенту iRNA по изобретению через одновалентный линкер. В некоторых вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к агенту iRNA по изобретению через двухвалентный линкер. Еще в других вариантах осуществления изобретения по изобретению, GalNAc или производное GalNAc присоединены к агенту iRNA по изобретению через трехвалентный линкер. В других вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к агенту iRNA по изобретению через четырехвалентный линкер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi по изобретению содержат один GalNAc или производное GalNAc, присоединенные к агенту iRNA, например, к 5'-концу смысловой цепи агента dsRNA или к 5'-концу одной или обеих смысловых цепей агента iRNA с двойным нацеливанием, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты двухцепочечной RNAi по изобретению содержат ряд (например, 2, 3, 4, 5 или 6) GalNAc или производных GalNAc, независимо присоединенных к ряду нуклеотидов агента двухцепочечной RNAi через ряд одновалентных линкеров.

В некоторых вариантах осуществления изобретения например, когда двухцепочечный агент iRNA по изобретению является частью одной большей молекулы, соединенной непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образуя шпильку, содержащую ряд неспаренных нуклеотидов, каждый неспаренный нуклеотид в петле шпильки может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенные через одновалентный линкер.

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

Дополнительные углеводные конъюгаты и линкеры, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают описанные в WO 2014/179620 и WO 2014/179627, полное содержание каждого из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

D. Линкеры

В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат или лиганд, описанный в настоящем документе, может быть присоединен к олигонуклеотиду iRNA с помощью различных линкеров, которые могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми.

Термин «линкер» или «связывающая группа» означает органический фрагмент, который соединяет две части соединения, например, ковалентно связывает две части соединения. Линкеры обычно содержат прямую связь или атом, такой как кислород или сера, звено, такое как NR₈, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH или цепь атомов, такую как, но не ограничиваясь этим, замещенный или незамещенный алкил замещенный или

незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил, алкинилгетероциклилалкил, алкинилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, один или несколько метиленов которых могут быть прерваны или оканчиваются O, S, S(O), SO₂, N(R₈), C(O), замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероциклил; где R₈ представляет собой водород, ацил, алифатическую или замещенную алифатическую группу. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер находится между около 1-24 атомами, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18 атомами, 7-17, 8-17, 6-16, 7-16 или 8-16 атомами.

Расщепляемая линкерная группа является достаточно стабильной вне клетки, но которая при попадании в клетку-мишень расщепляется с высвобождением двух частей, удерживаемых вместе линкером. В предпочтительном варианте осуществления изобретения расщепляемая связующая группа расщепляется по меньшей мере примерно в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или более или по меньшей мере примерно в 100 раз быстрее в клетке-мишени или в первом эталонном состоянии (которое может, например, быть выбрано так, чтобы имитировать или представлять внутриклеточные условия), чем в крови субъекта, или во втором эталонном состоянии (которое может, например, быть выбрано для имитации или представления состояний, обнаруживаемых в крови или сыворотке).

Расщепляемые линкерные группы чувствительны к расщепляющим агентам, например, pH, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию разрушающих молекул. Как правило, расщепляющие агенты более распространены или обнаруживаются на более высоких уровнях или активности внутри клеток, чем в сыворотке или крови. Примеры таких разлагающих агентов включают: окислительно-восстановительные агенты, выбранные для конкретных субстратов или не обладающие субстратной специфичностью, включая, например, окислительные или восстановительные ферменты или восстановительные агенты, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать редокс-расщепляемую связующую группу путем снижения; эстеразы; эндосомы или агенты, которые могут создавать кислую среду, например, такие, которые приводят к pH, равному пяти или ниже; ферменты, которые могут

гидролизовать или расщеплять расщепляемую кислотой связующую группу, действуя как общая кислота, пептидазы (которые могут быть субстрат-специфичными) и фосфатазы.

Расщепляемая связующая группа, такая как дисульфидная связь, может быть чувствительна к pH. pH сыворотки человека составляет 7,4, в то время как средний внутриклеточный pH немного ниже и колеблется примерно в пределах 7,1-7,3. Эндосомы имеют более кислый pH в диапазоне 5,5-6,0, а лизосомы имеют еще более кислый pH около 5,0. Некоторые линкеры будут иметь расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется при предпочтительном pH, тем самым высвобождая катионный липид из лиганда внутри клетки или в нужном компартменте клетки.

Линкер может включать расщепляемую линкерную группу, расщепляемую конкретным ферментом. Тип расщепляемой линкерной группы, включенной в линкер, может зависеть от целевой клетки. Например, лиганд, нацеленный на печень, может быть связан с катионным липидом через линкер, который включает сложноэфирную группу. Клетки печени богаты эстеразами, поэтому линкер будет расщепляться более эффективно в клетках печени, чем в типах клеток, не богатых эстеразами. Другие типы клеток, богатые эстеразами, включают клетки легких, коры почек и яичек.

Линкеры, содержащие пептидные связи, можно использовать для нацеливания на типы клеток, богатые пептидазами, такие как клетки печени и синовиоциты.

Как правило, пригодность расщепляемой линкерной группы-кандидата можно оценить путем тестирования способности разлагающего агента (или условия) расщеплять линкерную группу-кандидата. Также будет желательно также протестировать расщепляемую связывающую группу-кандидата на способность сопротивляться расщеплению в крови или при контакте с другой тканью, не являющейся мишенью. Таким образом, можно определить относительную восприимчивость к расщеплению между первым и вторым состоянием, где первое выбрано как показатель расщепления в клетке-мишени, а второе выбрано как показатель расщепления в других тканях или биологических жидкостях, например, кровь или сыворотка. Оценки можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органов или тканей или на целых животных. Может быть полезно провести первоначальные оценки в бесклеточных или культуральных условиях и подтвердить дальнейшими оценками на целых животных. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения полезные соединения-кандидаты расщепляются по меньшей мере примерно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или примерно в 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

і. Окислительно-восстановительные расщепляемые связывающие группы

В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепляемая линкерная группа представляет собой расщепляемую окислительно-восстановительную линкерную группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером восстановительно расщепляемой линкерной группы является дисульфидная линкерная

группа (-S-S-). Чтобы определить, является ли потенциальная расщепляемая линкерная группа подходящей «восстанавливающе расщепляемой связующей группой», или, например, подходящей для использования с конкретной частью iRNA и конкретным нацеливающим агентом, можно обратиться к методам, описанным в настоящем документе. Например, кандидат можно оценить путем инкубации с дитиотреитом (DTT), или другим восстанавливающим агентом с использованием реагентов, известных в данной области техники, которые имитируют скорость расщепления, наблюдаемую в клетке, например, клетке-мишени. Кандидаты также могут быть оценены в условиях, которые выбраны так, чтобы имитировать условия крови или сыворотки. В одном случае соединения-кандидаты расщепляются не более чем на 10% в крови. В других вариантах осуществления изобретения полезные соединения-кандидаты разлагаются по меньшей мере в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или примерно в 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий). Скорость расщепления соединений-кандидатов можно определить с помощью стандартных анализов ферментативной кинетики в условиях, выбранных для имитации внутриклеточной среды, и сравнить с условиями, выбранными для имитации внеклеточной среды.

ii. Расщепляемые линкерные группы на основе фосфатов

В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепляемый линкер содержит расщепляемую линкерную группу на основе фосфата. Расщепляемая связующая группа на основе фосфата расщепляется агентами, которые разлагают или гидролизуют фосфатную группу. Примером агента, расщепляющего фосфатные группы в клетках, являются такие ферменты, как фосфатазы в клетках. Примерами связывающих групп на основе фосфата являются -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S. Примерами вариантов осуществления изобретения являются -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, -O-P(S)(H)-S-, где Rk в каждом случае может независимо представлять собой C1-C20 алкил, C1-C20 галогеналкил, C6-C10 арил или C7-C12 аралкил. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения связующая группа на основе фосфата представляет собой -O-P(O)(OH)-O-. Эти кандидаты могут быть оценены с использованием методов, аналогичных описанным выше.

iii. Кислотно расщепляемые линкерные группы

В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепляемый линкер содержит расщепляемую кислотой линкерную группу. Расщепляемая кислотой линкерная группа представляет собой линкерную группу, которая расщепляется в кислых условиях. В предпочтительных вариантах осуществления расщепляемые кислотой линкерные группы расщепляются в кислой среде с pH примерно 6,5 или ниже (например, примерно 6,0, 5,75,

5,5, 5,25, 5,0 или ниже) или с помощью агентов, таких как ферменты, которые могут действовать как обычная кислота. В клетке специфические органеллы с низким pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечивать расщепляющую среду для расщепляемых кислотой связующих групп. Примеры расщепляемых кислотой линкерных групп включают, но не ограничиваются ими, гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Кислотные расщепляемые группы могут иметь общую формулу $-C=NN-$, $C(O)O$ или $-OC(O)-$. В предпочтительном варианте углерод, присоединенный к кислороду сложного эфира (алкоксигруппе), представляет собой арильную группу, замещенную алкильную группу или третичную алкильную группу, такую как диметилпентил или трет-бутил. Эти кандидаты могут быть оценены с использованием методов, аналогичных описанным выше.

iv. Расщепляемые линкерные группы на основе сложного эфира

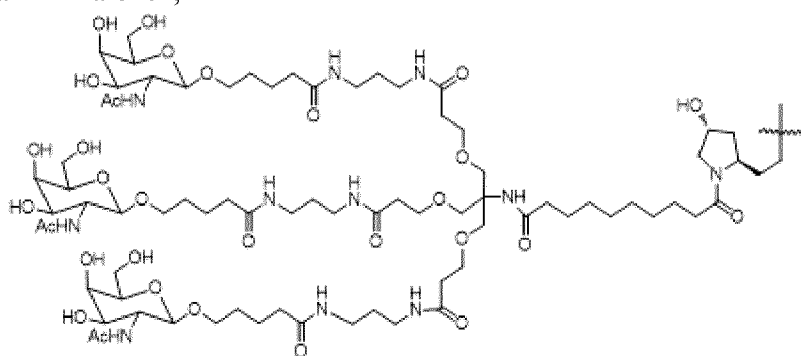
В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепляемый линкер содержит расщепляемую линкерную группу на основе сложного эфира. Расщепляемая связующая группа на основе сложного эфира расщепляется в клетках ферментами, такими как эстеразы и амидазы. Примеры расщепляемых связующих групп на основе сложных эфиров включают, но не ограничиваются ими, сложные эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Расщепляемые сложноэфирные линкерные группы имеют общую формулу $-C(O)O-$ или $-OC(O)-$. Эти кандидаты могут быть оценены с использованием методов, аналогичных описанным выше.

v. Расщепляемые линкерные группы на основе пептидов

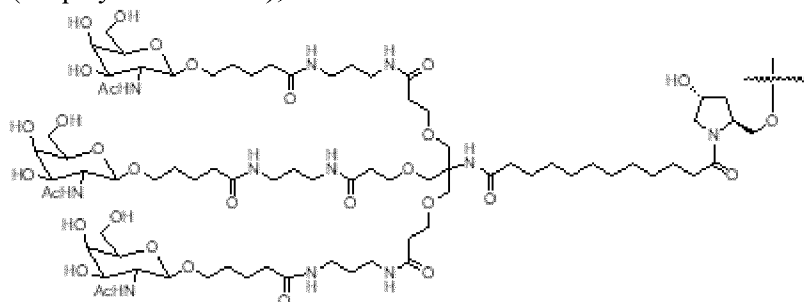
В еще одном варианте осуществления изобретения расщепляемый линкер содержит расщепляемую линкерную группу на основе пептида. Расщепляемая линкерная группа на основе пептида расщепляется ферментами, такими как пептидазы и протеазы в клетках. Расщепляемые связывающие группы на основе пептидов представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами с образованием олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т. д.) и полипептидов. Расщепляемые группы на основе пептидов не включают амидную группу ($-C(O)NH-$). Амидная группа может быть образована любым алкиленом, алкениленом или алкиниленом. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образующейся между аминокислотами с образованием пептидов и белков. Группа расщепления на основе пептида обычно ограничена пептидной связью (то есть амидной связью), образованной между аминокислотами, дающими пептиды и белки, и не включает всю амидную функциональную группу. Расщепляемые линкерные группы на основе пептидов имеют общую формулу $-NHCH(RA)C(O)NHCH(RB)C(O)-$, где RA и RB представляют собой R-группы двух соседних аминокислот. Эти кандидаты могут быть оценены с использованием методов, аналогичных описанным выше.

В некоторых вариантах осуществления изобретения iRNA по изобретению конъюгирован с углеводом через линкер. Неограничивающие примеры углеводных

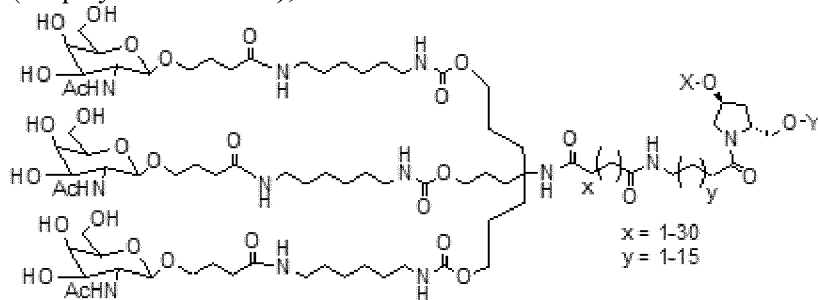
конъюгатов iRNA с линкерами композиций и способов по изобретению включают, но этим не ограничиваются,



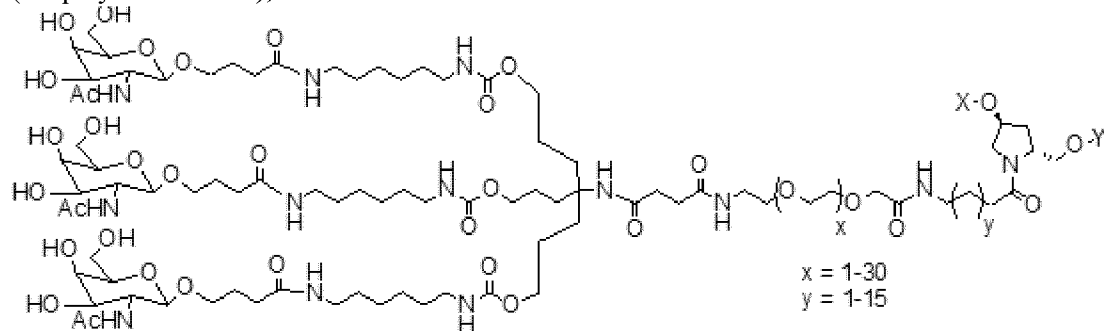
(Формула XXXVII),



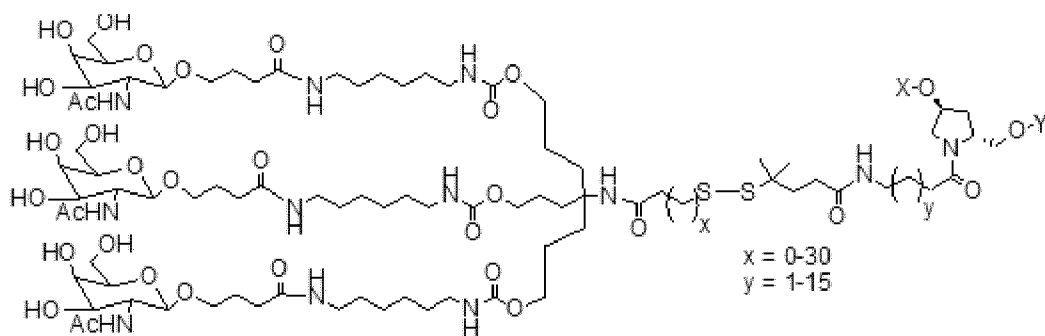
(Формула XXXVIII),



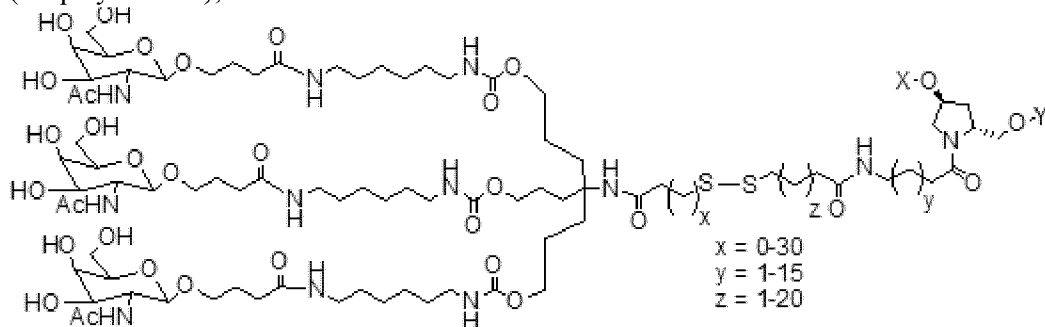
(Формула XXXIX),



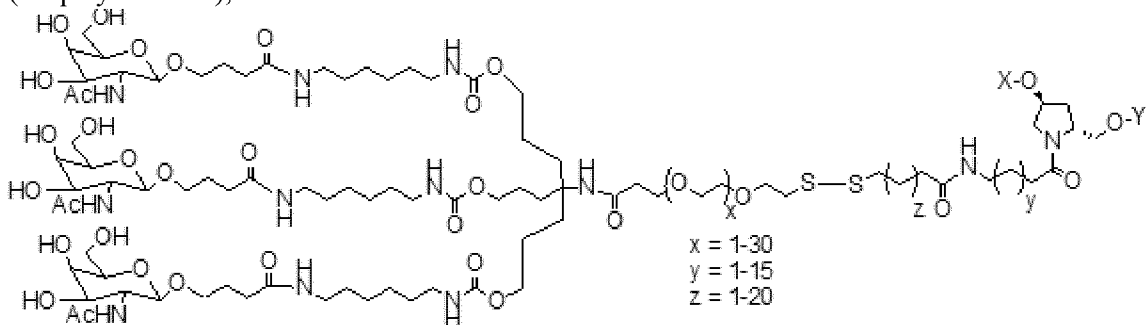
(Формула XL),



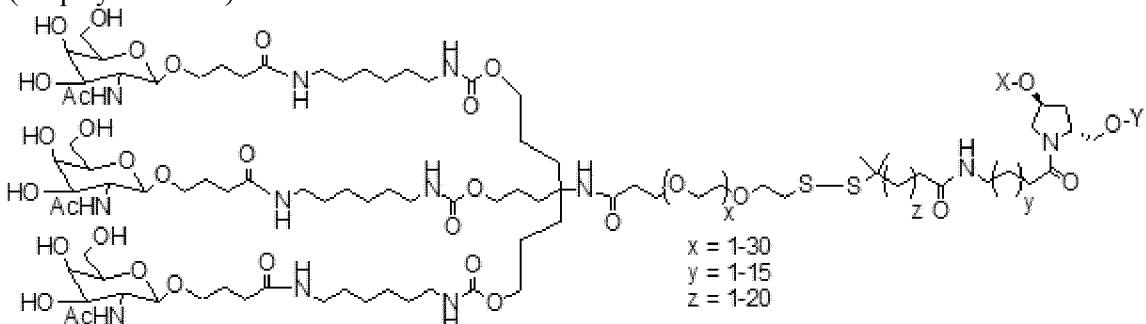
(Формула XLI),



(Формула XLII),



(Формула XLIII) и

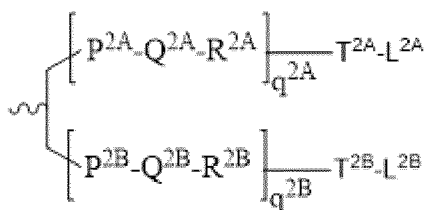


(Формула XLIV),

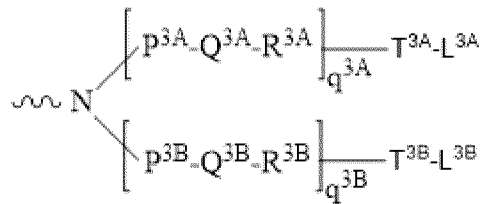
когда один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиций и способов по изобретению лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc (N-ацетилгалактозамина), присоединенных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

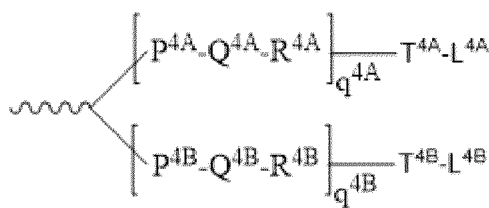
В некоторых вариантах осуществления изобретения dsRNA по изобретению конъюгирован с двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, показанных в любой из формул (XLV)-(XLVI):



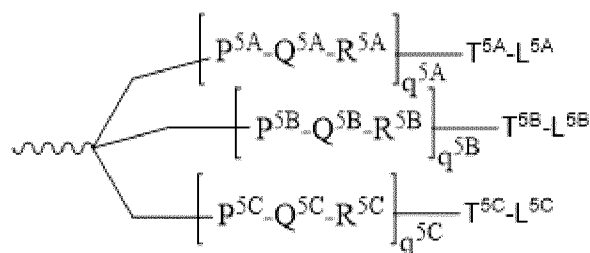
Формула XXXXV



Формула XLVI



Формула XLVII



Формула XLVIII

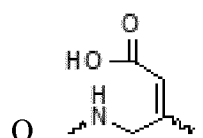
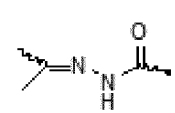
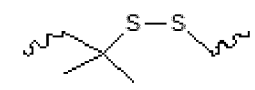
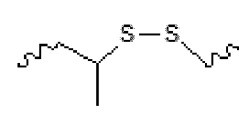
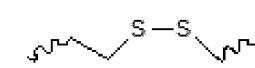
где:

q^{2A} , q^{2B} , q^{3A} , q^{3B} , q^{4A} , q^{4B} , q^{5A} , q^{5B} и q^{5C} , независимо, в каждом случае представляют собой 0-20 и где повторяющееся звено может быть одинаковым или разным;

R^{2A} , R^{2B} , R^{3A} , R^{3B} , R^{4A} , R^{4B} , R^{5A} , R^{5B} , R^{5C} , T^{2A} , T^{2B} , T^{3A} , T^{3B} , T^{4A} , T^{4B} , T^{5A} , T^{5B} , T^{5C} каждый, независимо, в каждом случае отсутствуют, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH или CH₂O;

Q^{2A} , Q^{2B} , Q^{3A} , Q^{3B} , Q^{4A} , Q^{4B} , Q^{5A} , Q^{5B} , Q^{5C} , независимо, в каждом случае отсутствуют, алкилен, замещенный алкилен, в котором один или несколько метиленов могут быть прерваны или оканчиваются одним или несколькими из O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

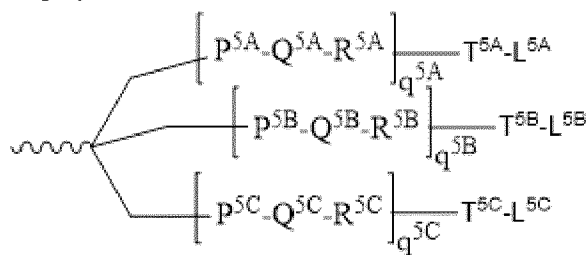
R^{2A} , R^{2B} , R^{3A} , R^{3B} , R^{4A} , R^{4B} , R^{5A} , R^{5B} , R^{5C} каждый, независимо, в каждом случае отсутствует, NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-

O, , , , ,  или гетероцикл;

L^{2A} , L^{2B} , L^{3A} , L^{3B} , L^{4A} , L^{4B} , L^{5A} , L^{5B} и L^{5C} представляют собой лиганд; то есть каждый, независимо, в каждом случае а моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и R^a представляет собой H или боковую цепь аминокислоты. Трехвалентные конъюгирующие производные GalNAc особенно полезны

для применения с агентами RNAi для ингибирования экспрессии гена-мишени, такими как агенты формулы (XLIX):

Формула XLIX



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

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп, конъюгирующих производные GalNAc, включают, но не ограничиваются ими, структуры, приведенные выше в виде формул II, VII, XI, X и XIII.

Репрезентативные патенты США, в которых рассказывается о получении конъюгатов RNA, включают, но не ограничиваются ими, патенты США №№ 4828979, 4948882, 5218105, 5525465, 5541313, 5545730, 5552538, 5578717 5580731, 5591584, 5109124, 5118802, 5138045, 5414077, 5486603, 5512439, 5578718, 5608046, 4587044, 4605735, 4667025, 4762779, 4789737, 4824941, 4835263, 4876335, 4904582, 4958013, 5082830, 5112963, 5214136, 5082830, 5112963, 5214136, 5245022, 5254469, 5258506, 5262536, 5272250, 5292873, 5317098, 5371241 5391723, 5416203 5451463, 5510475, 5512667, 5514785, 5565552, 5567810, 5574142, 5585481, 5587371, 5595726, 5597696, 5599923, 5599928, 5688941, 6294664, 6320017, 6576752, 6783931, 6900297, 7037646 и 8106022 полное содержание каждого из указанных включено в настоящее описание посредством ссылки.

Нет необходимости, чтобы все положения в данном соединении были модифицированы одинаково, и фактически более чем одна из вышеупомянутых модификаций может быть включена в одно соединение или даже в один нуклеозид в iRNA. Настоящее изобретение также включает соединения iRNA, которые являются химерными соединениями.

«Химерные» соединения iRNA или «химеры» в контексте настоящего изобретения представляют собой соединения iRNA, предпочтительно, агенты dsRNA, которые содержат две или более химически различных областей, каждая из которых состоит по крайней мере из одного мономерного звена, то есть в случае соединения dsRNA. Эти iRNA обычно содержат по меньшей мере одну область, в которой RNA модифицирована таким образом, чтобы придать iRNA повышенную устойчивость к деградации нуклеазами, повышенное поглощение клетками или повышенную аффинность связывания с нуклеиновой кислотой-мишенью. Дополнительный участок iRNA может служить субстратом для ферментов, способных расщеплять гибриды RNA:DNA или RNA:RNA. В качестве примера, в работе Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008 а Н представляет собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет цепь RNA дуплекса RNA:DNA. Таким образом, активация RNase H приводит к расщеплению RNA-

мишени, тем самым значительно повышая эффективность ингибирования экспрессии генов iRNA. Следовательно, сопоставимые результаты часто могут быть получены с более короткими iRNA, когда используются химерные dsRNA, по сравнению с фосфоротиоат-дезоксидными dsRNA, гибридизующимися с той же областью-мишенью. Расщепление RNA-мишени можно обычным образом обнаружить с помощью гель-электрофореза и, при необходимости, с помощью методов гибридизации ассоциированных нуклеиновых кислот, известных в данной области.

В некоторых случаях RNA iRNA может быть модифицирована нелигандной группой. Ряд нелигандных молекул был конъюгирован с iRNA для усиления активности, клеточного распределения или клеточного поглощения iRNA, и процедуры для выполнения таких конъюгаций доступны в научной литературе. Такие нелигандные фрагменты включают липидные фрагменты, такие как холестерин (Kubo, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), холевую кислоту (Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), тиоэфир, например, гексил-S-тритилтиол (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), тиохолестерин (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), алифатическую цепь, например, додекандиоловые или ундецильные остатки (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49), фосфолипид, например, ди-гексадецил-гас-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-О-гексадецил-гас-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969), или адамантануксусную кислоту (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), пальмитильную группу (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229) или октадециламиновый или гексиламино-карбонилкоксихолестериновый фрагмент (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Типичные патенты США, в которых описано получение таких конъюгатов RNA, перечислены выше. Типичные протоколы конъюгации включают синтез RNA, несущих амиолинкер в одном или нескольких положениях последовательности. Затем аминогруппа вступает в реакцию с конъюгируемой молекулой с использованием соответствующих связывающих или активирующих реагентов. Реакцию конъюгации можно проводить либо с RNA, все еще связанной с твердой подложкой, либо после расщепления RNA в фазе раствора. Очистка конъюгата RNA с помощью ВЭЖХ обычно дает чистый конъюгат.

V. Исследование нокдауна APOE *in vivo*

Были созданы модели мышей с ноккаутом человеческого APOE, включая трансгенных мышей, экспрессирующих одну или несколько изоформ APOE человека (смотри, например, Trommer, *et al.* (2005) *Neuroreport* 15:2655-2658) и могут быть использованы для демонстрации *in vivo* эффективности агентов RNAi, предложенных в настоящем документе.

Также были созданы мышинные модели нейродегенеративного заболевания, связанного с АРОЕ (например, болезни Альцгеймера), и их можно дополнительно использовать для демонстрации эффективности *in vivo* агентов RNAi, предложенных в настоящем документе. Такие модели могут сочетать трансгенную экспрессию одной или нескольких изоформ АРОЕ человека с конститутивной или индуцируемой экспрессией, например, сверхэкспрессией, например, белка-предшественника амилоида человека (APP), в некоторых случаях включая патогенную мутацию (например, шведскую мутацию (KM670/671NL)), конститутивную или индуцируемую экспрессию, например, сверхэкспрессию, человеческий пресенилин 1 (PS1), в некоторых случаях включающий патогенную мутацию (например, L166P) (смотри, например, Huynh, *et al.* (2017) *Neuron* 96: 1013-1023), и/или конститутивную или индуцируемую экспрессию, например, сверхэкспрессию человеческого тау-белка 1N4R, в некоторых случаях содержащую патогенную мутацию (например, мутацию P301S) (Shi, *et al.* (2017) *Nature* 549: 523-527).

VI. Доставка агента RNAi по изобретению

Доставка агента RNAi по изобретению в клетку, например, в клетку субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект, страдающий АРОЕ-ассоциированным нейродегенеративным заболеванием, например, амилоид- β -опосредованным заболеванием, таким как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и церебральная амилоидная ангиопатия, или тау-опосредованным заболеванием, например, первичной таупатией, такой как лобно-височная деменция (FTD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кордикобазальная дегенерация (CBD), болезнь Пика (PiD), глобулярные глиальные таупатии (GGT), лобно-височная деменция с паркинсонизмом (FTDP, FTDP-17), хроническая травматическая энцефалопатия (CTE), кулачная деменция, лобно-височная долевая дегенерация (FTLD), аргирофильная зерновая болезнь (AGD) и первичная возрастная таупатия (PART) или вторичная таупатия, например, AD, болезнь Крейцфельда-Якоба, синдром Дауна и семейная британская деменция может быть осуществлена различными способами. Например, доставка может осуществляться путем контакта клетки с агентом RNAi по настоящему изобретению либо *in vitro*, либо *in vivo*. Доставка *in vivo* также может осуществляться непосредственно путем введения субъекту композиции, содержащей агент RNAi, например, dsRNA. Альтернативно, доставка *in vivo* может быть осуществлена косвенно путем введения одного или нескольких векторов, которые кодируют и управляют экспрессией агента RNAi. Эти альтернативы обсуждаются ниже.

В общем, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) может быть адаптирован для использования с агентом RNAi по изобретению (смотри, например, Akhtar S. and Julian RL., (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 и WO94/02595, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Для доставки *in vivo* факторы, которые необходимо учитывать для доставки агента RNAi включают, например, биологическую стабильность доставляемого агента, предотвращение неспецифических эффектов и накопление доставляемого агента в ткани-мишени.

Неспецифические эффекты агента RNAi можно свести к минимуму путем местного введения, например, прямой инъекцией или имплантацией в ткань или местным введением препарата. Местное введение в место лечения максимизирует локальную концентрацию агента, ограничивает воздействие агента на системные ткани, которые в противном случае могут быть повреждены агентом или которые могут разлагать агент, и позволяет вводить более низкую общую дозу агента RNAi. Несколько исследований показали успешный нокдаун генных продуктов при локальном введении агента RNAi. Например, внутриглазная доставка dsRNA VEGF путем интравитреальной инъекции яванским макакам (Tolentino, MJ. *et al.*, (2004) *Retina* 24:132-138) и субретинальных инъекций мышам (Reich, SJ. *et al.* (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216), обе были показаны для предотвращения неоваскуляризации в экспериментальной модели возрастной дегенерации желтого пятна. Кроме того, прямая внутриопухолевая инъекция dsRNA мышам уменьшает объем опухоли (Pille, J. *et al.* (2005) *Mol. Ther.* 11:267-274) и может увеличить выживаемость мышей с опухолями (Kim, WJ. *et al.*, (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350; Li, S. *et al.*, (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523). RNA-интерференция также показала успех при локальной доставке в ЦНС путем прямой инъекции (Dorn, G. *et al.*, (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH. *et al.* (2005) *ген Ther.* 12:59-66; Makimura, H. *et al.* (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., *et al.* (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., *et al.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya, Y., *et al.* (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602) и в легкие путем интраназального введения (Howard, KA. *et al.*, (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X. *et al.*, (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Bitko, V. *et al.*, (2005) *Nat. Med.* 11:50-55). Для системного введения агента RNAi для лечения заболевания RNA может быть модифицирована или альтернативно доставлена с использованием системы доставки лекарственного средства; оба метода предотвращают быструю деградацию dsRNA эндо- и экзонуклеазами *in vivo*. Модификация RNA или фармацевтического носителя также может обеспечить нацеливание агента RNAi на ткань-мишень и избежать нежелательных нецелевых эффектов (например, не желая быть связанными какой-либо теорией, было установлено, что использование GNA, как описано в настоящем документе, дестабилизирует исходную область dsRNA, что приводит к повышенному предпочтению таких dsRNA в отношении эффективности воздействия на мишень по сравнению с нецелевыми эффектами, такими как такие нецелевые эффекты значительно ослабляются такой дестабилизацией исходной области). Агенты RNAi могут быть модифицированы путем химической конъюгации с липофильными группами, такими как холестерин, для усиления захвата клетками и предотвращения деградации. Например, агент RNAi, направленный против AroB, конъюгированного с липофильным фрагментом холестерина, системно вводили мышам, что приводило к нокдауну mRNA AroB как в печени, так и в тощей кишке (Soutschek, J. *et al.*, (2004) *Nature* 432:173-178). Было показано, что конъюгация агента RNAi с аптамером ингибирует рост опухоли и опосредует регрессию опухоли в мышинной модели рака предстательной железы (McNamara, JO. *et al.*, (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). В альтернативном варианте осуществления агент RNAi может быть доставлен с

использованием систем доставки лекарственных средств, таких как наночастицы, дендример, полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки облегчают связывание молекулы агента RNAi (отрицательно заряженной), а также усиливают взаимодействие на отрицательно заряженной клеточной мембране, обеспечивая эффективное поглощение агента RNAi клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры можно либо связать с агентом RNAi, либо вызвать образование везикулы или мицеллы (смотри, например, Kim SH. *et al.*, (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), которая заключает в себе агент RNAi. Образование везикул или мицелл дополнительно предотвращает деградацию агента RNAi при системном введении. Способы получения и введения комплексов катионный агент-агент RNAi находятся в пределах возможностей специалиста в данной области (смотри, например, Sorensen, DR., *et al.* (2003) *J. Mol. Biol* 327:761-766; Verma, UN. *et al.*, (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS *et al.* (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарств, подходящих для системной доставки агентов RNAi включают DOTAP (Sorensen, DR., *et al.* (2003), см. выше; Verma, UN. *et al.*, (2003), см. выше), олигофектамин, «твердые липидные частицы нуклеиновой кислоты» (Zimmermann, TS. *et al.*, (2006) *Nature* 441:111-114), кардиолипид (Chien, PY. *et al.*, (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A. *et al.*, (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), полиэтиленимин (Bonnet ME. *et al.*, (2008) *Pharm. Res.* Aug 16 Epub, до выхода в печать; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), пептиды Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487), и полиамидоамины (Tomalia, DA. *et al.*, (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H. *et al.*, (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). В некоторых вариантах осуществления изобретения агент RNAi образует комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции агентов RNAi и циклодекстринов можно найти в патенте США № 7427605, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Некоторые аспекты настоящего описания относятся к способу снижения экспрессии гена-мишени АРОЕ в клетке, включающему приведение указанной клетки в контакт с агентом двухцепочечной RNAi по изобретению. В одном варианте осуществления изобретения клетка представляет собой клетку печени, необязательно гепатоцит. В одном варианте осуществления изобретения клетка представляет собой внепеченочную клетку, необязательно клетку ЦНС.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу снижения экспрессии гена-мишени АРОЕ у субъекта, включающему введение субъекту агент двухцепочечной RNAi по изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта, страдающего АРОЕ-ассоциированным нейродегенеративным заболеванием, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества агента двухцепочечной RNAi по изобретению, тем самым излечивая субъекта. Примеры расстройства ЦНС, которые

можно лечить способом по изобретению, включают амилоид- β -опосредованные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и церебральная амилоидная ангиопатия, и тау-опосредованные заболевания, например, первичные таупатии, такие как лобно-височная деменция (FTD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кордико базальная дегенерация (CBD), болезнь Пика (PiD), глобулярные глиальные таупатии (GGT), лобно-височная деменция с паркинсонизмом (FTDP, FTDP-17), хроническая травматическая энцефалопатия (СТЕ), кулачная деменция, лобно-височная долевая дегенерация (FTLD), аргирофильная зерновая болезнь (AGD) и первичная возрастная таупатия (PART), и вторичные таупатии, например, AD, болезнь Крейтцфельда-Якоба, синдром Дауна и семейная британская деменция. В одном варианте осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi вводят подкожно.

В одном варианте осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi вводят интратекально. Путем интратекального введения агента двухцепочечной RNAi способ может снижать экспрессию гена-мишени APOE в тканях головного мозга (например, полосатого тела) или позвоночника, например, в коре головного мозга, мозжечке, шейном отделе позвоночника, поясничном отделе позвоночника и грудном отделе позвоночника.

Для простоты изложения составы, композиции и способы в этом разделе обсуждаются в основном в отношении модифицированных соединений siRNA. Однако следует понимать, что эти составы, композиции и способы можно применять на практике с другими соединениями siRNA, и например, с немодифицированными соединениями siRNA, и такая практика находится в рамках настоящего описания. Композиция, которая включает агент RNAi, может быть доставлена субъекту различными путями. Типичные пути введения включают: интратекальный, внутривенный, местный, ректальный, анальный, вагинальный, назальный, легочный и глазной.

Агенты RNAi по изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции обычно включают один или несколько видов агента RNAi и фармацевтически приемлемый носитель. Как используется в настоящем изобретении, термин «фармацевтически приемлемый носитель» предназначен для включения любых и всех растворителей, дисперсионных сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых средств, изотонических средств и средств, замедляющих абсорбцию, и тому подобное, совместимых с фармацевтическим введением. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением случаев, когда какие-либо обычные среды или агенты несовместимы с активным соединением, предполагается их использование в композициях. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить несколькими способами в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение, и от обрабатываемой области. Введение может быть местным (включая глазное, вагинальное, ректальное, интраназальное, чрескожное), пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную капельную, подкожную,

внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию, интратекальное или внутрижелудочковое введение.

Путь и место введения могут быть выбраны для улучшения нацеливания. Например, для нацеливания на мышечные клетки логичным выбором будет внутримышечная инъекция в интересующие мышцы. На клетки легких можно воздействовать путем введения агента RNAi. Путь и место введения могут быть выбраны для улучшения нацеливания. Например, для нацеливания на мышечные клетки логичным выбором будет внутримышечная инъекция в интересующие мышцы. На клетки легких можно воздействовать путем введения агента RNAi и механически вводя RNA.

Составы для местного применения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Могут быть необходимы или желательны обычные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и тому подобное. Также могут быть использованы кондомы с покрытием, перчатки и тому подобное.

Композиции для перорального введения включают порошки или гранулы, суспензии или растворы в воде, сиропы, эликсиры или неводные среды, таблетки, капсулы, леденцы или пастилки. В случае таблеток носители, которые можно использовать, включают лактозу, цитрат натрия и соли фосфорной кислоты. В таблетках обычно используются различные разрыхлители, такие как крахмал, и смазывающие вещества, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк. Для перорального введения в форме капсул полезными разбавителями являются лактоза и высокомолекулярные полиэтиленгликоли. Когда для перорального применения требуются водные суспензии, композиции нуклеиновых кислот можно комбинировать с эмульгирующими и суспендирующими агентами. При желании могут быть добавлены определенные подсластители или ароматизаторы.

Композиции для интратекального или внутрижелудочкового введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки.

Составы для парентерального введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Внутрижелудочковая инъекция может быть облегчена с помощью внутрижелудочкового катетера, например, прикрепленного к резервуару. Для внутривенного применения можно контролировать общую концентрацию растворенных веществ, чтобы сделать препарат изотоническим.

В одном варианте осуществления изобретения введение композиции соединения siRNA, например, двухцепочечного соединения siRNA или соединения ssiRNA, является парентеральным, например, внутривенным (например, в виде болюса или в виде диффузионной инфузии), внутрикожным, внутрибрюшинным, внутримышечным, интратекальным, внутрижелудочковым, внутричерепным, подкожным, чресслизистым, буккальным, подъязычным, эндоскопическим, ректальным, пероральным, вагинальным,

местным, ингаляционным, интраназальным, уретральным или глазным. Введение может осуществляться субъектом или другим лицом, например поставщиком медицинских услуг. Лекарство может поставляться в отмеренных дозах или в дозаторе, который выдает отмеренную дозу. Выбранные способы доставки обсуждаются более подробно ниже.

Инtrateкальное введение.

В одном варианте осуществления изобретения агент двухцепочечной RNAi доставляется путем инtrateкальной инъекции (то есть инъекции в спинномозговую жидкость, которая омывает ткань головного и спинного мозга). Инtrateкальная инъекция агентов RNAi в спинномозговую жидкость может быть выполнена в виде болюсной инъекции или с помощью мининасосов, которые можно имплантировать под кожу, обеспечивая регулярную и постоянную доставку siRNA в спинномозговую жидкость. Циркуляция спинномозговой жидкости из сосудистого сплетения, где она вырабатывается, вниз вокруг спинного мозга и ганглиев задних корешков, а затем вверх, мимо мозжечка и через кору к паутинным грануляциям, где жидкость может выйти из ЦНС, в зависимости от размера, стабильности и растворимости вводимых соединений молекулы, доставляемые инtrateкально, может позволять поражать мишени по всей ЦНС.

В некоторых вариантах осуществления изобретения инtrateкальное введение осуществляется с помощью помпы. Насос может представлять собой хирургически имплантированный осмотический насос. В одном варианте осуществления изобретения осмотический насос имплантируют в субарахноидальное пространство спинномозгового канала для облегчения инtrateкального введения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения инtrateкальное введение осуществляется через систему инtrateкальной доставки фармацевтического препарата, включающую резервуар, содержащий определенный объем фармацевтического агента, и насос, сконфигурированный для доставки части фармацевтического агента, содержащегося в резервуаре. Более подробную информацию об этой системе инtrateкальной доставки можно найти в WO 2015/116658, который полностью включен в качестве ссылки.

Количество инtrateкально инъецируемых агентов RNAi может варьироваться от одного гена-мишени к другому гену-мишени, и подходящее количество, которое необходимо применять, может определяться индивидуально для каждого гена-мишени. Обычно это количество составляет от 10 мкг до 2 мг, предпочтительно от 50 мкг до 1500 мкг, более предпочтительно от 100 мкг до 1000 мкг.

Агенты RNAi по изобретению, кодируемые вектором

Агенты RNAi, нацеленные на ген APOE, могут экспрессироваться из единиц транскрипции, встроенных в векторы DNA или RNA (смотри, например, Couture, A, *et al.*, *TIG.* (1996), 12:5-10; WO 00/22113, WO 00/22114, и US 6054299). Экспрессия предпочтительно поддерживается (месяцы или дольше) в зависимости от конкретной используемой конструкции и типа ткани или клетки-мишени. Эти трансгены могут быть введены в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может быть интегрирующим или неинтегрирующим вектором. Трансген также

может быть сконструирован так, чтобы его можно было наследовать как внехромосомную плазмиду (Gassmann, *et al.*, (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1292).

Индивидуальная цепь или цепи агента RNAi могут быть транскрибированы с промотора на векторе экспрессии. Если две отдельные цепи должны быть экспрессированы для получения, например, dsRNA, два отдельных вектора экспрессии могут быть совместно введены (например, путем трансфекции или инфекции) в клетку-мишень. Альтернативно, каждая отдельная цепь dsRNA может транскрибироваться промоторами, оба из которых расположены на одной и той же экспрессионной плазмиде. В одном варианте осуществления dsRNA экспрессируется в виде полинуклеотидов с инвертированными повторами, соединенных линкерной полинуклеотидной последовательностью, так что dsRNA имеет структуру стержня и петли.

Векторы экспрессии агента RNAi обычно представляют собой плазмиды DNA или вирусные векторы. Векторы экспрессии, совместимые с эукариотическими клетками, предпочтительно совместимые с клетками позвоночных, можно использовать для получения рекомбинантных конструкций для экспрессии агента RNAi, описанного в настоящем документе. Доставка векторов, экспрессирующих агент RNAi, может быть системной, например, путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в клетки-мишени, эксплантированные у пациента, с последующим повторным введением в организм пациента, или любым другим способом, позволяющим осуществить введение в желаемую клетку-мишень.

Вирусные векторные системы, которые можно использовать с описанными в настоящем документе способами и композициями, включают, но этим не ограничиваются, (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, включая, но не ограничиваясь ими, лентивирусные векторы, вирус мышинного лейкоза Молони и т. д.; (c) аденоассоциированные вирусные векторы; (d) векторы вируса простого герпеса; (e) векторы SV 40; (f) векторы вируса полиомы; (g) векторы вируса папилломы; (h) пикорнавирусные векторы; (i) векторы вируса оспы, такие как ортопокс, например, векторы вируса коровьей оспы или авипокс, например, оспа канареек или оспа кур; и (j) хелпер-зависимый или безвнутренний аденовирус. Также могут быть полезными вирусы с дефектом репликации. Различные векторы включаются или не включаются в геном клеток. При желании конструкции могут включать вирусные последовательности для трансфекции. Альтернативно, конструкция может быть включена в векторы, способные к эпизомальной репликации, например, векторы EPV и EBV. Конструкции для рекомбинантной экспрессии агента обычно требуют регуляторных элементов, например промоторов, энхансеров и т. д., для обеспечения экспрессии агента RNAi в клетках-мишенях. Другие аспекты, которые следует учитывать для векторов и конструкций, известны в данной области.

VII. Фармацевтическая композиции по изобретению

Настоящее описание также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают агенты RNAi по изобретению. В одном варианте осуществления изобретения в настоящем документе предложены фармацевтическая композиции,

содержащие агент RNAi, описанный в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие агент RNAi, могут быть использованы для лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией или активностью APOE, например, APOE-ассоциированного нейродегенеративного заболевания, такого как амилоид- β -опосредованное заболевание, например, болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и церебральная амилоидная ангиопатия, тау-опосредованного заболевания, например, первичной таупатии, такой как лобно-височная деменция (FTD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кордикобазальная дегенерация (CBD), болезнь Пика (PiD), глобулярные глиальные таупатии (GGT), лобно-височная деменция с паркинсонизмом (FTDP, FTDP-17), хроническая травматическая энцефалопатия (СТЕ), кулачная деменция, лобно-височная долевая дегенерация (FTLD), аргирофильная зерновая болезнь (AGD) и первичная возрастная таупатия (PART) или вторичная таупатия, например, AD, болезнь Крейтцфельда-Якоба, синдром Дауна и семейная британская деменция.

Такие фармацевтические композиции готовят на основе способа доставки. Одним из примеров являются композиции, составленные для системного введения посредством парентеральной доставки, например, внутривенной (IV), внутримышечной (IM) или подкожной (subQ) доставки. Другим примером являются композиции, изготовленные для прямой доставки в ЦНС, например, интратекальным или интравитреальным путем инъекции, необязательно, путем инфузии в головной мозг (например, полосатое тело), такой как непрерывная инфузия с помощью насоса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции по изобретению являются апирогенными или непирогенными.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена APOE. Как правило, подходящая доза агента RNAi по настоящему изобретению будет находиться в диапазоне от около 0,001 до около 200,0 мг на килограмм массы тела реципиента в день, как правило, в диапазоне примерно от 1 до 50 мг на килограмм массы тела человека в день.

Режим повторных доз может включать введение терапевтического количества агента RNAi на регулярной основе, например, от одного раза в месяц до одного раза в шесть месяцев. В некоторых вариантах осуществления изобретения агент RNAi вводят примерно от одного раза в квартал (то есть примерно один раз каждые три месяца) до около двух раз в год.

После первоначального режима лечения (например, нагрузочной дозы) лечение можно проводить реже.

В других вариантах осуществления изобретения разовая доза фармацевтических композиций может быть продолжительной, так что последующие дозы вводят с интервалом не более 1, 2, 3 или 4 или более месяцев. В некоторых вариантах осуществления изобретения разовую дозу фармацевтических композиций согласно изобретению вводят один раз в месяц. В других вариантах осуществления изобретения разовую дозу

фармацевтических композиций согласно изобретению вводят от одного раза в квартал до двух раз в год.

Специалисты в данной области техники понятно, что определенные факторы могут влиять на дозировку и сроки, необходимые для эффективного лечения субъекта, включая, помимо прочего, тяжесть заболевания или расстройства, предыдущее лечение, общее состояние здоровья или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания. Более того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством композиции может включать однократное лечение или серию обработок.

Достижения в области генетики мышей привели к созданию ряда мышинных моделей для изучения различных APOE-ассоциированных нейродегенеративных заболеваний, при которых было бы эффективным снижение экспрессии APOE. Такие модели можно использовать для тестирования агентов RNAi *in vivo*, а также для определения терапевтически эффективной дозы. Подходящие мышинные модели известны в данной области и включают, например, мышинные модели, описанные в другой части настоящего документа.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить несколькими способами в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение, и от обрабатываемой области. Введение может быть местным (например, с помощью трансдермального пластыря), ингаляционным, например, путем ингаляции или вдывания порошков или аэрозолей, в том числе с помощью небулайзера; интратрахеально, интраназально, эпидермально и чрескожно, перорально или парентерально. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; подкожно, например, через имплантированное устройство; или внутричерепное, например, внутрипаренхиматозное, интратекальное или желудочковое введение.

Агенты RNAi могут быть доставлены таким образом, чтобы нацеливаться на конкретную ткань, такую как печень, ЦНС (например, нейрональную, глиальную или сосудистую ткань головного мозга) или как на печень, так и на ЦНС.

Фармацевтические композиции и составы для местного применения могут включать чрескожные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Могут быть необходимы или желательны обычные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и тому подобное. Также могут быть использованы кондомы с покрытием, перчатки и тому подобное. Подходящие составы для местного применения включают такие, в которых агенты RNAi, представленные в описании, находятся в смеси с агентом для местной доставки, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие агенты и поверхностно-активные вещества. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеоилфосфатидил DOPE этаноламин, димиристоилфосфатидилхолин DMPC, дистеаролфосфатидилхолин), отрицательные (например, димиристоилфосфатидилглицерин DMPG) и катионные (например,

диолеоилтетраметиламинопропил DOTAP и диолеоилфосфатидилэтаноламин DOTMA). Агенты RNAi, представленные в описании, могут быть инкапсулированы в липосомы или могут образовывать с ними комплексы, в частности, с катионными липосомами. Альтернативно, агенты RNAi могут образовывать комплексы с липидами, в частности, с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают, но не ограничиваются ими, арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту, эйкозановую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додecilазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или C₁₋₂₀-алкиловый эфир (например, изопропилмиристат IPM), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль. Составы для местного применения подробно описаны в патенте США 6747014, который включен в настоящий документ в качестве ссылки.

А. Составы агентов RNAi, содержащие мембранные молекулярные сборки

Агент RNAi для применения в композициях и способах по настоящему изобретению может быть составлен для доставки в виде мембранной молекулярной сборки, например, липосомы или мицеллы. Как используется в настоящем документе, термин «липосома» относится к везикуле, состоящей из амфифильных липидов, расположенных по меньшей мере в одном бислое, например, в одном бислое или во множестве бислоев. Липосомы включают однослойные и многослойные везикулы, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала, и водную внутреннюю часть. Водная часть содержит композицию агента RNAi. Липофильный материал изолирует водную внутреннюю часть от водной внешней среды, которая обычно не включает композицию агента RNAi, хотя в некоторых примерах это может быть. Липосомы полезны для переноса и доставки активных ингредиентов к месту действия. Поскольку липосомальная мембрана структурно подобна биологическим мембранам, при нанесении липосом на ткань липосомальный бислой сливается с бислоем клеточных мембран. По мере слияния липосомы и клетки, внутреннее водное содержимое, которое включает агент RNAi, доставляется в клетку, где агент RNAi может специфически связываться с RNA-мишенью и может опосредовать активность RNAi. В некоторых случаях липосомы также специально направлены, например, для направления агента RNAi к определенным типам клеток.

Липосомы, содержащие агент RNAi, могут быть получены различными способами. В одном примере липидный компонент липосомы растворяют в детергенте, так что с липидным компонентом образуются мицеллы. Например, липидный компонент может представлять собой амфипатический катионный липид или липидный конъюгат. Детергент может иметь высокую критическую концентрацию мицеллообразования и может быть неионогенным. Примеры детергентов включают холат, CHAPS, октилглюкозид, дезоксихолат и лауроилсаркозин. Затем препарат агента RNAi добавляют к мицеллам, которые включают липидный компонент. Катионные группы липида взаимодействуют с агентом RNAi и конденсируются вокруг агента RNAi с образованием липосомы. После

конденсации детергент удаляют, например, диализом, чтобы получить липосомальный препарат агента RNAi.

При необходимости соединение-носитель, которое способствует конденсации, может быть добавлено во время реакции конденсации, например, путем контролируемого добавления. Например, соединение-носитель может представлять собой полимер, отличный от нуклеиновой кислоты (например, спермин или спермидин). pH также можно отрегулировать, чтобы способствовать конденсации.

Способы получения стабильных носителей для доставки полинуклеотидов, которые включают комплекс полинуклеотид/катионный липид в качестве структурных компонентов носителя для доставки, дополнительно описаны, например, в WO 96/37194, полное содержание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки. Формирование липосом также может включать один или несколько аспектов иллюстративных способов, описанных Felgner, P. L. *et al.*, (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8:7413-7417; патент Соединенных Штатов № 4897355; патент Соединенных Штатов № 5171678; Bangham *et al.*, (1965) *M. Mol. Biol.* 23:238; Olson *et al.*, (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 557:9; Szoka *et al.*, (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 4194; Mayhew *et al.*, (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 775:169; Kim *et al.*, (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 728:339; и Fukunaga *et al.*, (1984) *Endocrinol.* 115:757. Обычно используемые методы приготовления липидных агрегатов подходящего размера для использования в качестве средств доставки включают обработку ультразвуком и замораживание-оттаивание плюс экструзию (см., например, Mayer *et al.*, (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 858:16. Микрофлюидизацию можно использовать, когда желательны неизменно небольшие (от 50 до 200 нм) и относительно однородные агрегаты ((Mayhew *et al.*, (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 775:169. Эти способы легко адаптируются для упаковки препаратов агента RNAi в липосомы.

Липосомы делятся на два широких класса. Катионные липосомы представляют собой положительно заряженные липосомы, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновой кислоты с образованием стабильного комплекса. Положительно заряженный комплекс нуклеиновая кислота/липосома связывается с отрицательно заряженной поверхностью клетки и интернализуется в эндосоме. Из-за кислого pH внутри эндосом липосомы разрываются, высвобождая свое содержимое в цитоплазму клетки (Wang *et al.* (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147:980-985).

Липосомы, чувствительные к pH или отрицательно заряженные, захватывают нуклеиновые кислоты, а не образуют с ними комплексы. Поскольку и нуклеиновая кислота, и липид заряжены одинаково, происходит отталкивание, а не образование комплекса. Тем не менее, некоторое количество нуклеиновой кислоты находится внутри водной среды этих липосом. Липосомы, чувствительные к pH, использовались для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих ген тимидинкиназы, в клеточные монослои в культуре. Экспрессию экзогенного гена обнаруживали в клетках-мишенях ((Zhou *et al.* (1992) *Journal of Controlled Release*, 19:269-274).

Один из основных типов липосомальной композиции включает фосфолипиды, отличные от фосфатидилхолина природного происхождения. Нейтральные липосомальные композиции, например, могут быть получены из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Анионные липосомальные композиции обычно образуются из димиристоилфосфатидилглицерина, в то время как анионные фузогенные липосомы образуются главным образом из диолеоилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Другой тип липосомальной композиции образован из фосфатидилхолина (PC), такого как, например, соевый PC и яичный PC. Другой тип образуется из смесей фосфолипидов, фосфатидилхолина или холестерина.

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

Неионогенные липосомальные системы также были исследованы для определения их пригодности для доставки лекарств к коже, в частности, системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионогенные липосомальные составы, содержащие Novasome™ I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome™ II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) использовали для доставки циклоспорина-А в дерму кожи мыши. Результаты показали, что такие неионогенные липосомальные системы эффективно способствуют отложению циклоспорина А в различные слои кожи. (Hu *et al.*, (1994) *S.T.P. Pharma. Sci.*, 4(6):466).

Липосомы также включают «стерически стабилизированные» липосомы, термин, который в данном контексте относится к липосомам, содержащим один или несколько специализированных липидов, которые при включении в липосомы приводят к увеличению времени жизни в циркуляции по сравнению с липосомами, не содержащими таких специализированных липидов. Примерами стерически стабилизированных липосом являются липосомы, в которых часть образующей везикулы липидной части липосомы (А) содержит один или несколько гликолипидов, таких как моносиалоганглиозид GM1, или (В) дериватизирована одним или несколькими гидрофильными полимерами, такими как фрагмент полиэтиленгликоля (PEG). Без намерения следовать какой-либо определенной теории, в данной области техники считается, что, по крайней мере, для стерически стабилизированных липосом, содержащих ганглиозиды, сфингомиелин или липиды, дериватизированные PEG, увеличенный период полужизни этих стерически стабилизированных липосом обусловлен снижением поглощения клетками ретикулоэндотелиальной системы (RES) (Allen *et al.*, (1987) *FEBS Letters*, 223:42; Wu *et al.*, (1993) *Cancer Research*, 53:3765).

В данной области известны различные липосомы, содержащие один или несколько гликолипидов. Papahadjopoulos *et al.* (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, (1987), 507:64) сообщают о

способности моносиалоганглиозида GM1, галактоцереброзида сульфата и фосфатидилинозита улучшать время полужизни липосом в крови. Эти результаты были изложены Gabizon *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (1988), 85:6949). В патенте США № 4837028 и WO 88/04924, оба выданных Allen *et al.*, описаны липосомы, содержащие (1) сфингомиелин и (2) ганглиозид G_{M1} или сульфатный эфир галактоцереброзида. В патенте США № 5543152 (Webb *et al.*) описаны липосомы, содержащие сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn-димиристоилфосфатидилхолин, описаны в WO 97/13499 (Lim *et al.*).

В одном варианте осуществления изобретения используются катионные липосомы. Преимущество катионных липосом заключается в том, что они способны сливаться с клеточной мембраной. Некатионные липосомы, хотя и не способны так же эффективно сливаться с плазматической мембраной, поглощаются макрофагами *in vivo* и могут использоваться для доставки агентов RNAi в макрофаги.

Дополнительные преимущества липосом включают: липосомы, полученные из природных фосфолипидов, являются биосовместимыми и биоразлагаемыми; липосомы могут включать широкий спектр водорастворимых и жирорастворимых лекарственных средств; липосомы могут защищать инкапсулированные агенты RNAi в их внутренних компартментах от метаболизма и деградации ((Rosoff, «Pharmaceutical Dosage Forms», Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245). Важными факторами при приготовлении липосомальных составов являются поверхностный заряд липидов, размер везикул и водный объем липосом.

Положительно заряженный синтетический катионный липид, N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N, N,N-триметиламмоний хлорид (DOTMA), можно использовать для образования небольших липосом, которые спонтанно взаимодействуют с нуклеиновой кислотой с образованием комплексов липид-нуклеиновых кислот, которые способны сливаться с отрицательно заряженными липидами клеточных мембран клеток культуры тканей, что приводит к доставке агента RNAi (см., например, Felgner, P. L. *et al.*, (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8:7413-7417, и патент Соединенных штатов № 4897355 для описания DOTMA и ее использования с DNA).

Аналог DOTMA, 1,2-бис(олеилокси)-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP), можно использовать в сочетании с фосфолипидом для образования DNA-комплексообразующих везикул. Lipofectin™ Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) является эффективным средством для доставки нуклеиновых кислот с высоким содержанием аниона в клетки культуры живых тканей, которые содержат положительно заряженные липосомы DOTMA, которые спонтанно взаимодействуют с отрицательно заряженными полинуклеотидами с образованием комплексов. Когда используется достаточное количество положительно заряженных липосом, суммарный заряд образующихся комплексов также положительный. Полученные таким образом положительно заряженные комплексы спонтанно прикрепляются к отрицательно заряженным клеточным поверхностям, сливаются с плазматической мембраной и эффективно доставляют функциональные нуклеиновые кислоты, например, в клетки

тканевых культур. Другой коммерчески доступный катионный липид, 1,2-бис(олеоилокси)-3,3-(триметиламмоний)пропан («DOTAP») (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana), отличается от DOTMA тем, что олеоиловые фрагменты связаны сложноэфирными, а не эфирными связями.

Другие зарегистрированные катионные липидные соединения включают те, которые были конъюгированы с различными остатками, включая, например, карбокиспермин, который был конъюгирован с одним из двух типов липидов, и включает такие соединения, как 5-карбокиспермилглицин диоктаолеоиламид («DOGS») (Transfectam™), Promega, Madison, Wisconsin) и дипальмитоилфосфатидилэтаноламин-5-карбокиспермиламид («DPPEs») (см., например, патент США № 5171678).

Другой конъюгат катионного липида включает дериватизацию липида с холестерином («DC-Chol»), который был составлен в виде липосом в сочетании с DOPE (см. Gao, X. and Huang, L., (1991) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280). Сообщалось, что липополилизин, полученный конъюгированием полилизина с DOPE, эффективен для трансфекции в присутствии сыворотки (Zhou, X. *et al.*, (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8). Утверждается, что для некоторых клеточных линий эти липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, проявляют меньшую токсичность и обеспечивают более эффективную трансфекцию, чем композиции, содержащие DOTMA. Другие коммерчески доступные катионные липидные продукты включают DMR1E и DMR1E-HP (Vical, La Jolla, California) и липофектамин (DOSPA) (Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland). Другие катионные липиды, подходящие для доставки олигонуклеотидов, описаны в WO 98/39359 и WO 96/37194.

Липосомальные составы особенно подходят для местного применения, липосомы обладают рядом преимуществ по сравнению с другими составами. Такие преимущества включают снижение побочных эффектов, связанных с высокой системной абсорбцией вводимого лекарственного средства, повышенное накопление вводимого лекарственного средства в требуемой мишени и возможность введения агента RNAi в кожу. В некоторых реализациях липосомы используются для доставки агента RNAi в клетки эпидермиса, а также для усиления проникновения агента RNAi в ткани дермы, например, в кожу. Например, липосомы можно применять местно. Задokumentирована местная доставка лекарственных препаратов в виде липосом на кожу (см., например, Weiner *et al.*, (1992) *Journal of Drug Targeting*, vol. 2, 405-410 and du Plessis *et al.*, (1992) *Antiviral Research*, 18:259-265; Mannino, R. J. and Fould-Fogerite, S., (1998) *Biotechniques* 6:682-690; Itani, T. *et al.*, (1987) *Gene* 56:267-276; Nicolau, C. *et al.* (1987) *Meth. Enzymol.* 149:157-176; Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. (1983) *Meth. Enzymol.* 101:512-527; Wang, C. Y. and Huang, L., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855).

Неионогенные липосомальные системы также исследовали для определения их пригодности для доставки лекарственных средств к коже, в частности, системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионогенные липосомальные составы, содержащие Novasome I

(глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), использовали для доставки лекарственного средства в дерму кожи мыши. Такие составы с агентом RNAi применимы для лечения дерматологического заболевания.

Липосомы, включающие агенты RNAi, можно сделать сильно деформируемыми. Такая деформируемость может позволить липосомам проникать через поры меньше среднего радиуса липосомы. Например, трансферсомы представляют собой разновидность деформируемых липосом. Трансферсомы могут быть получены путем добавления активаторов края поверхности, обычно поверхностно-активных веществ, к стандартной липосомальной композиции. Трансферсомы, которые включают агент RNAi, могут быть доставлены, например, подкожно путем инфицирования для доставки агента RNAi к кератиноцитам кожи. Чтобы проникнуть сквозь неповрежденную кожу млекопитающих, липидные везикулы должны пройти через серию тонких пор, каждая диаметром менее 50 нм, под влиянием подходящего трансдермального градиента. Кроме того, благодаря липидным свойствам эти трансферсомы могут быть самооптимизирующимися (адаптивными к форме пор, например, в коже), самовосстанавливающимися и часто достигающими своих целей без фрагментации, а часто и самозагружающимися.

Другие составы, соответствующие настоящему описанию, описаны в предварительных заявках США с серийными номерами 61/018616, подана 2 января 2008 г.; 61/018611, подана 2 января 2008 г.; 61/039748, подана 26 марта 2008 г.; 61/047087, подана 22 апреля 2008 г., и 61/051528, подана 8 мая 2008 г. В заявке РСТ номер РСТ/US2007/080331, поданной 3 октября 2007 г., также описываются составы, подходящие для настоящего изобретения.

Трансферсомы, еще один тип липосом, представляют собой сильно деформируемые агрегаты липидов, которые являются привлекательными кандидатами в качестве средств доставки лекарств. Трансферсомы можно описать как капли липидов, которые настолько сильно деформируются, что легко могут проникать через поры, которые меньше самой капли. Трансферсомы адаптируются к среде, в которой они используются, например, они самооптимизируются (адаптируются к форме пор кожи), самовосстанавливаются, часто достигают своих мишеней без фрагментации и часто самозагружаются. Для изготовления трансферсом к стандартной липосомальной композиции можно добавить активаторы поверхностных краев, обычно поверхностно-активные вещества. Трансферсомы использовались для доставки сывороточного альбумина в кожу. Показано, что опосредованная трансферсомами доставка сывороточного альбумина столь же эффективна, как и подкожная инъекция раствора, содержащего сывороточный альбумин.

Поверхностно-активные вещества находят широкое применение в составах, таких как описанные в настоящем документе, особенно в эмульсиях (включая микроэмульсии) и липосомах. Наиболее распространенный способ классификации и ранжирования свойств многих различных типов поверхностно-активных веществ, как природных, так и синтетических, заключается в использовании баланса гидрофильных/липофильных

веществ (HLB). Природа гидрофильной группы (также известной как «головка») обеспечивает наиболее полезные средства для классификации различных поверхностно-активных веществ, используемых в препаратах (Rieger, *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Если молекула поверхностно-активного вещества не ионизирована, она классифицируется как неионогенное поверхностно-активное вещество. Неионогенные поверхностно-активные вещества находят широкое применение в фармацевтических и косметических продуктах и могут использоваться в широком диапазоне значений pH. Как правило, их значения HLB колеблются от 2 до около 18 в зависимости от их структуры. Неионогенные поверхностно-активные вещества включают неионогенные сложные эфиры, такие как сложные эфиры этиленгликоля, сложные эфиры пропиленгликоля, сложные эфиры глицерина, сложные эфиры полиглицерина, сложные эфиры сорбитана, сложные эфиры сахарозы и этоксилированные сложные эфиры. К этому классу также относятся неионогенные алканоламиды и простые эфиры, такие как этоксилаты жирных спиртов, пропоксилированные спирты и этоксилированные/пропоксилированные блок-полимеры. Полиоксиэтиленовые поверхностно-активные вещества являются наиболее популярными представителями класса неионогенных поверхностно-активных веществ.

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

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

Если молекула поверхностно-активного вещества способна нести как положительный, так и отрицательный заряд, то поверхностно-активное вещество классифицируется как амфотерное. Амфотерные поверхностно-активные вещества включают производные акриловой кислоты, замещенные алкиламидами, N-алкилбетаины и фосфатиды.

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

Агент RNAi для применения в способах настоящего изобретения также может быть представлен в виде мицеллярных составов. «Мицеллы» определяются в настоящем

документе как особый тип молекулярной сборки, в которой амфипатические молекулы расположены в сферической структуре так, что все гидрофобные части молекул направлены внутрь, оставляя гидрофильные части в контакте с окружающей водной фазой. Обратное расположение существует, если среда гидрофобна.

Смешанная мицеллярная композиция, подходящая для доставки через трансдермальные мембраны, может быть приготовлена путем смешивания водного раствора композиции siRNA, алкилсульфата щелочного металла с числом атомов углерода от C₈ до C₂₂ и соединений, образующих мицеллы. Примеры мицеллообразующих соединений включают лецитин, гиалуроновую кислоту, фармацевтически приемлемые соли гиалуроновой кислоты, гликолевую кислоту, молочную кислоту, экстракт ромашки, экстракт огурца, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, моноолеин, моноолеаты, монолаураты, масло огуречника, масло примулы вечерней, ментол, тригидроксиоксохоланилглицин и его фармацевтически приемлемые соли, глицерин, полиглицерин, лизин, полилизин, триолеин, полиоксиэтиленовые эфиры и их аналоги, полидоканолалкиловые эфиры и их аналоги, хенодезоксихолат, дезоксихолат и их смеси. Соединения, образующие мицеллы, можно добавлять одновременно или после добавления алкилсульфата щелочного металла. Смешанные мицеллы будут образовываться практически при любом смешивании ингредиентов, кроме интенсивного смешивания, чтобы получить мицеллы меньшего размера.

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

В смешанную мицеллярную композицию можно добавить фенол или м-крезол для стабилизации состава и защиты от роста бактерий. Альтернативно, к мицеллообразующим ингредиентам можно добавить фенол или м-крезол. Изотонический агент, такой как глицерин, также может быть добавлен после образования смешанной мицеллярной композиции.

Для доставки мицеллярного состава в виде спрея состав может быть помещен в аэрозольный дозатор, и дозатор заправляют пропеллентом. Пропеллент, находящийся под давлением, находится в дозаторе в жидком виде. Соотношения ингредиентов подобраны таким образом, чтобы водная и пропеллентная фазы стали единым целым, то есть была бы одна фаза. При наличии двух фаз необходимо встряхнуть дозатор перед выдачей порции содержимого, например, через дозирующий клапан. Распределенная доза фармацевтического агента выбрасывается из дозирующего клапана в виде тонкой струи.

Пропелленты могут включать водородсодержащие хлорфторуглероды, водородсодержащие фторуглероды, диметиловый эфир и диэтиловый эфир. В некоторых вариантах осуществления изобретения можно использовать HFA 134a (1,1,1,2-тетрафторэтан).

Конкретные концентрации основных ингредиентов можно определить с помощью относительно простых экспериментов. Для всасывания через ротовую полость часто желательно увеличить, например, по меньшей мере вдвое или втрое дозу для инъекций или введения через желудочно-кишечный тракт.

Липидные частицы

Агенты RNAi, например, dsRNA согласно настоящему изобретению, могут быть полностью инкапсулированы в липидный состав, например, LNP или другую частицу нуклеиновой кислоты-липиды.

Используемый в настоящем документе термин «LNP» относится к стабильной липидной частице нуклеиновой кислоты. LNP обычно содержит катионный липид, некатионный липид и липид, предотвращающий агрегацию частицы (например, конъюгат PEG-липид). LNP чрезвычайно полезны для системных применений, поскольку они демонстрируют более длительное время циркуляции после внутривенной (в/в) инъекции и накапливаются в удаленных местах (например, местах, физически отделенных от места введения). LNP включают «pSPLP», которые включают инкапсулированный комплекс конденсирующий агент-нуклеиновая кислота, как указано в WO 00/03683. Частицы по настоящему изобретению обычно имеют средний диаметр от около 50 нм до около 150 нм, более типично от около 60 нм до около 130 нм, более типично от около 70 нм до около 110 нм, наиболее типично от около 70 нм до около 90 нм, и практически нетоксичны. Кроме того, нуклеиновые кислоты, если они присутствуют в липидных частицах нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, устойчивы в водном растворе к расщеплению нуклеазой. Липидно-нуклеиновые кислоты и способ их получения описаны, например, в патентах США №№ 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; публикации патента США № 2010/0324120 и WO 96/40964.

В одном варианте осуществления изобретения соотношение липидов к лекарственному средству (соотношение масса/масса) (например, соотношение липидов к dsRNA) будет находиться в диапазоне от около 1:1 до около 50:1, от около 1:1 до около 25:1, от около 3:1 до около 15:1, от около 4:1 до около 10:1, от около 5:1 до около 9:1 или от около 6:1 до около 9:1. Диапазоны, промежуточные по отношению к указанным выше диапазонам, также рассматриваются как часть изобретения.

Некоторые конкретные составы LNP для доставки агентов RNAi были описаны в данной области, включая, например, составы «LNP01», как описано, например, в WO 2008/042973, который включен в настоящее описание посредством ссылки.

Дополнительные иллюстративные составы липид-dsRNA указаны в таблице ниже.

	Ионизируемый/катионный липид	катионный липид/некатионный липид/холестерин/конъюгат PEG-липид Соотношение липид:siRNA
SNALP-1	1,2-Дилиноленилокси-N, N-диметиламинопропан (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/Холестерин/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) липид: siRNA~7:1
2-XTC	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DPPC/Холестерин/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 липид: siRNA~7:1
LNP05	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/Холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид: siRNA~6:1
LNP06	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/Холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид: siRNA~11:1
LNP07	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/Холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, липид: siRNA~6:1
LNP08	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/Холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, липид: siRNA~11:1
LNP09	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/Холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5

		Липид:siRNA 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N, N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100)	ALN100/DSPC/Холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA 10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил 4-(диметиламино)бутаноат (MC3)	MC-3/DSPC/Холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазанедиил)дидодекан-2-ол (Tech G1)	Tech G1/DSPC/Холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 40/15/40/5 Липид:siRNA: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 Липид:siRNA: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA: 7:1

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

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин

DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин

PEG-DMG: PEG-дидимристоилглицерин (C14-PEG или PEG-C14) (PEG со средней молекулярной массой 2000 г.)

PEG-DSG: PEG-дистирилглицерин (C18-PEG или PEG-C18) (PEG со средней молекулярной массой 2000)

PEG-cDMA: PEG-карбамоил-1,2-димиристилоксипропиламин (PEG со средней молекулярной массой 2000 г.)

Составы, содержащие SNALP (1,2-дилиноленилокси-N, N-диметиламинопропан (DLinDMA)) описаны в WO 2009/127060, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Составы, содержащие ХТС, описаны в WO 2010/088537, полное содержание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Составы, содержащие MC3, описаны, например, в публикации патента США № 2010/0324120, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Составы, содержащие ALNY-100, описаны в WO 2010/054406, полное содержание которой включено сюда в качестве ссылки.

Составы, содержащие C12-200, описаны в WO 2010/129709, полное содержание которых включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводных средах, капсулы, гелевые капсулы, саше, таблетки или минитаблетки. Могут быть желательны загустители, ароматизаторы, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие добавки или связующие вещества. В некоторых вариантах осуществления изобретения пероральные составы представляют собой составы, в которых dsRNA, представленные в описании, вводят в сочетании с одним или несколькими поверхностно-активными веществами, усиливающими проникновение, и хелаторами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты или их сложные эфиры или соли, желчные кислоты или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли включают хенодезоксихолевую кислоту (CDCA) и урсodeзоксиходезоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюконовую кислоту, гликолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, таурodeзоксихолевую кислоту, тауро-24,25-дигидрофузидат натрия и гликодигидрофузидат натрия. Подходящие жирные кислоты включают арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додecilазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемая соль (например, натриевая). В некоторых вариантах осуществления изобретения используются комбинации усилителей проникновения, например, жирные кислоты/соли в сочетании с желчными кислотами/солями. Одной типичной комбинацией является натриевая соль лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA. Другие усилители проникновения включают полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир. dsRNA, представленные в описании, могут быть доставлены перорально, в гранулированной форме, включая высушенные распылением частицы, или в виде комплексов с образованием микро- или наночастиц. Агенты, образующие комплекс dsRNA, включают полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксэтаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные желатины, альбумины, крахмалы, акрилаты, полиэтиленгликоли (PEG) и крахмалы; полиалкилцианоакрилаты; полиимины, поллуланы, целлюлозы и крахмалы, дериватизированные DEAE. Подходящие комплексообразователи включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламинметилэтилен P(TDAE), полиаминостирол (например, п-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D, L-молочная кислота), поли(DL-молочная-ко-гликолевая кислота (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG). Пероральные составы для dsRNA и их получение подробно описаны в патенте США

6887906, US 2003/0027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в настоящий документ в качестве ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интрапаренхиматозного (в мозг), подоболочечного, внутрижелудочкового или внутривенного введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки, такие как, но этим не ограничиваясь, усилители проникновения, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, растворы, эмульсии и составы, содержащие липосомы. Эти композиции могут быть получены из множества компонентов, которые включают, но этим не ограничиваются, предварительно приготовленные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. Особенно предпочтительными являются составы, нацеленные на головной мозг при лечении заболеваний или расстройств, связанных с APP.

Фармацевтические составы по настоящему изобретению, которые могут быть представлены в стандартной лекарственной форме, могут быть приготовлены в соответствии с обычными методами, хорошо известными в фармацевтической промышленности. Такие методики включают стадию связывания активных ингредиентов с фармацевтическим носителем(ями) или наполнителем(ями). Как правило, составы изготавливают путем однородного и тесного связывания активных ингредиентов с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями или с ними обоими, а затем, при необходимости, придают продукту форму.

Композиции по настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде любой из многих возможных лекарственных форм, таких как, но этим не ограничиваясь, таблетки, капсулы, гелевые капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели, суппозитории и клизмы. Композиции по настоящему изобретению также могут быть приготовлены в виде суспензий в водной, неводной или смешанной среде. Водные суспензии могут дополнительно содержать вещества, повышающие вязкость суспензии, включая, например, натрийкарбоксиметилцеллюлозу, сорбит или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

Дополнительные составы

i. Эмульсии

Композиции по настоящему изобретению могут быть разработаны и приготовлены в виде эмульсий. Эмульсии обычно представляют собой гетерогенные системы одной жидкости, диспергированной в другой в виде капель, обычно превышающих 0,1 мкм в диаметре (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms,

Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi *et al.*, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Эмульсии часто представляют собой двухфазные системы, состоящие из двух несмешивающихся жидких фаз, тщательно перемешанных и диспергированных друг с другом. Как правило, эмульсии могут быть типа вода-в-масле (в/м) или масло-в-воде (м/в). Когда водная фаза тонко разделена и диспергирована в виде мельчайших капелек в объемной масляной фазе, полученная композиция называется эмульсией вода-в-масле (в/м). Альтернативно, когда масляная фаза тонко разделена и диспергирована в виде мельчайших капелек в объемной водной фазе, полученная композиция называется эмульсией масло-в-воде (м/в). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты помимо дисперсных фаз, а активное лекарственное средство может присутствовать в виде раствора либо в водной фазе, либо в масляной фазе, либо в виде отдельной фазы. Фармацевтические эксципиенты, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты, также могут присутствовать в эмульсиях по мере необходимости. Фармацевтические эмульсии также могут представлять собой множественные эмульсии, состоящие из более чем двух фаз, как, например, в случае масло-в-воде-в-масле (м/в/м) и вода-в-масле-в-масле (в/м/в) эмульсии. Такие сложные составы часто обеспечивают определенные преимущества, которых нет у простых бинарных эмульсий. Множественные эмульсии, в которых отдельные капли масла м/в-эмульсии заключают в себе небольшие капли воды, составляют эмульсию в/м/в. Аналогичным образом, система масляных капель, заключенных в глобулы воды, стабилизированные в маслянистой непрерывной фазе, образует эмульсию типа «м/в/м».

Эмульсии характеризуются незначительной или нулевой термодинамической стабильностью. Часто дисперсную или прерывистую фазу эмульсии хорошо диспергируют во внешней или непрерывной фазе и поддерживают в таком виде за счет эмульгаторов или вязкости состава. Любая из фаз эмульсии может быть полутвердой или твердой, как в случае мазевых основ и кремов эмульсионного типа. Другие способы стабилизации эмульсий включают использование эмульгаторов, которые могут быть включены в любую фазу эмульсии. Эмульгаторы можно разделить на четыре категории: синтетические поверхностно-активные вещества, природные эмульгаторы, абсорбирующие основы и мелкодисперсные твердые вещества (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как поверхностно-активные вещества, нашли широкое применение в составе эмульсий и были рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and

Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Поверхностно-активные вещества обычно являются амфифильными и содержат гидрофильную и гидрофобную части. Соотношение гидрофильной и гидрофобной природы поверхностно-активного вещества было названо гидрофильно-липофильным балансом (HLB) и является ценным инструментом для классификации и выбора поверхностно-активных веществ при приготовлении составов. Поверхностно-активные вещества можно разделить на различные классы в зависимости от природы гидрофильной группы: неионогенные, анионные, катионные и амфотерные (см., например, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY Rieger, *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

Природные эмульгаторы, используемые в составах эмульсий, включают ланолин, пчелиный воск, фосфатиды, лецитин и гуммиарабик. Абсорбирующие основы обладают гидрофильными свойствами, например, безводный ланолин и гидрофильный вазелин могут впитывать воду с образованием эмульсий вода/много, сохраняя при этом свою полутвердую консистенцию. Мелкодисперсные твердые вещества также использовались в качестве хороших эмульгаторов, особенно в сочетании с поверхностно-активными веществами и в вязких препаратах. К ним относятся полярные неорганические твердые вещества, такие как гидроксиды тяжелых металлов, ненабухающие глины, такие как бентонит, аттапульгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный алюмосиликат и коллоидный алюмосиликат магния, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как углерод или глицерилтристеарат.

Большое разнообразие неэмульгирующих материалов также включается в рецептуры эмульсий и вносит свой вклад в свойства эмульсий. К ним относятся жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, сложные эфиры жирных кислот, увлажнители, гидрофильные коллоиды, консерванты и антиоксиданты (Block, *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Гидрофильные коллоиды или гидроколлоиды включают встречающиеся в природе камеди и синтетические полимеры, такие как полисахариды (например, аравийская камедь, агар, альгиновая кислота, каррагинан, гуаровая камедь, камедь карайи и трагакант), производные целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлоза и карбоксипропилцеллюлоза) и синтетические полимеры (например, карбомеры, простые эфиры целлюлозы и карбоксивиниловые полимеры). Они диспергируются или набухают в воде с образованием коллоидных растворов, которые стабилизируют эмульсии за счет образования прочных межфазных пленок вокруг капель дисперсной фазы и увеличения вязкости внешней фазы.

Поскольку эмульсии часто содержат ряд ингредиентов, таких как углеводы, белки, стеролы и фосфатиды, которые могут легко поддерживать рост микробов, эти составы часто включают консерванты. Обычно используемые консерванты, входящие в состав эмульсий, включают метилпарабен, пропилпарабен, соли четвертичного аммония, хлорид бензалкония, сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты и борной кислоты. Антиоксиданты также обычно добавляют в составы эмульсий, чтобы предотвратить ухудшение состава. Используемые антиоксиданты могут представлять собой поглотители свободных радикалов, такие как токоферолы, алкилгаллаты, бутилированный гидроксанизол, бутилированный гидрокситолуол, или восстанавливающие агенты, такие как аскорбиновая кислота и метабисульфит натрия, и антиоксидантные синергисты, такие как лимонная кислота, винная кислота и лецитин.

Применение эмульсионных составов дерматологическими, пероральными и парентеральными путями и способы их производства были рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Эмульсионные составы для перорального введения очень широко используются из-за простоты приготовления, а также эффективности с точки зрения абсорбции и биодоступности (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Слабительные средства на основе минерального масла, маслорастворимые витамины и питательные препараты с высоким содержанием жира входят в число материалов, которые обычно вводят перорально в виде эмульсий масло/вода.

ii. Микроэмульсии

В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиции агентов RNAi и нуклеиновых кислот составляют в виде микроэмульсий. Микроэмульсию можно определить, как систему воды, масла и амфифила, которая представляет собой единый оптически изотропный и термодинамически стабильный жидкий раствор (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Как правило, микроэмульсии представляют собой системы, которые получают сначала путем диспергирования масла в водном растворе поверхностно-активного вещества, а затем добавления достаточного количества четвертого компонента, обычно спирта с промежуточной длиной цепи, для образования прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также были описаны как термодинамически

стабильные, изотропно чистые дисперсии двух несмешивающихся жидкостей, которые стабилизированы межфазными пленками поверхностно-активных молекул ((Leung and Shah, *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215). Микроэмульсии обычно готовят из комбинации от трех до пяти компонентов, которые включают масло, воду, поверхностно-активное вещество, дополнительное поверхностно-активное вещество и электролит. Тип микроэмульсии вода-в-масле (в/м) или масло в воде (м/в) зависит от свойств используемого масла и поверхностно-активного вещества, а также от структуры и геометрической упаковки полярные головки и углеводородные хвосты молекул поверхностно-активных веществ (Schott, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

Феноменологический подход с использованием фазовых диаграмм был тщательно изучен и дал специалисту в данной области исчерпывающие знания о том, как составлять микроэмульсии (см., например, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). По сравнению с обычными эмульсиями микроэмульсии обладают тем преимуществом, что солюбилизируют нерастворимые в воде лекарства в виде термодинамически стабильных капель, которые образуются спонтанно.

Поверхностно-активные вещества, используемые при приготовлении микроэмульсий, включают, но не ограничиваются ими, ионные поверхностно-активные вещества, неионогенные поверхностно-активные вещества, Brij 96, полиоксиэтиленолеиловые эфиры, сложные эфиры полиглицерина и жирных кислот, монолаурат тетраглицерина (ML310), моноолеат тетраглицерина (MO310), моноолеат гексаглицерина (PO310), пентаолеат гексаглицерина (PO500), монокаприлат декаглицерола (MCA750), моноолеат декаглицерина (MO750), секвиолеат декаглицерина (SO750), декаолеат декаглицерола (DAO750), отдельно или в комбинации с поверхностно-активным веществом. Поверхностно-активное вещество, обычно спирт с короткой цепью, такой как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит для увеличения межфазной текучести за счет проникновения в пленку поверхностно-активного вещества и, следовательно, создания неупорядоченной пленки из-за пустот, образующихся между молекулами поверхностно-активного вещества. Однако микроэмульсии можно приготовить без использования дополнительных поверхностно-активных веществ, и в данной области техники известны не содержащие спирта самоэмульгирующиеся микроэмульсионные системы. Водная фаза обычно может представлять собой, но не ограничивается ими, воду, водный раствор лекарственного средства, глицерин, PEG300, PEG400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляная фаза может включать, помимо прочего, такие материалы, как Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, сложные эфиры жирных кислот,

моно-, ди- и триглицериды со средней длиной цепи (C8-C12), полиоксиэтилированные глицеридовые эфиры жирных кислот, жирные спирты, полиглицеролизированные глицериды, насыщенные полиглицеролизированные глицериды C8-C10, растительные масла и силиконовое масло.

Микроэмульсии представляют особый интерес с точки зрения солюбилизации лекарственных средств и улучшения их всасывания. Было предложено использовать микроэмульсии на основе липидов (м/в и в/м) для повышения пероральной биодоступности лекарственных средств, включая пептиды (см., например, патенты США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides *et al.*, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). Микроэмульсии обладают такими преимуществами, как улучшенная солюбилизация лекарственного средства, защита лекарственного средства от ферментативного гидролиза, возможное усиление абсорбции лекарственного средства из-за вызванных сурфактантом изменений текучести и проницаемости мембраны, простота приготовления, легкость перорального введения по сравнению с твердыми лекарственными формами, улучшенная клиническая эффективность и снижение токсичности (см., например, патенты США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides *et al.*, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). Часто микроэмульсии могут образовываться самопроизвольно, когда их компоненты соединяются вместе при температуре окружающей среды. Это может быть особенно предпочтительно при составлении рецептур термолабильных лекарственных средств, пептидов или агентов RNAi. Микроэмульсии также оказались эффективными при трансдермальной доставке активных компонентов как в косметических, так и в фармацевтических целях. Ожидается, что микроэмульсионные композиции и составы по настоящему изобретению будут способствовать повышению системной абсорбции агентов RNAi и нуклеиновых кислот из желудочно-кишечного тракта, а также улучшать местное поглощение агентов RNAi и нуклеиновых кислот клетками.

Микроэмульсии по настоящему изобретению также могут содержать дополнительные компоненты и добавки, такие как сорбитанмоностеарат (Grill 3), лабразол и усилители проникновения, для улучшения свойств состава и усиления абсорбции агентов RNAi и нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Усилители проникновения, используемые в микроэмульсиях по настоящему изобретению, могут быть отнесены к одной из пяти широких категорий: поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие агенты и нехелатирующие не поверхностно-активные вещества (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Каждый из этих классов обсужден выше.

iii. Микрочастицы

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

iv. Усилители проникновения

В одном варианте осуществления изобретения в настоящем раскрытии используются различные усилители проникновения для обеспечения эффективной доставки нуклеиновых кислот, в частности агентов RNAi в кожу животных. Большинство лекарств присутствуют в растворе как в ионизированной, так и в неионизированной формах. Однако обычно только жирорастворимые или липофильные препараты легко проникают через клеточные мембраны. Было обнаружено, что даже нелипофильные лекарственные средства могут проникать через клеточные мембраны, если мембрана, которую необходимо пересечь, обработана усилителем проникновения. Помимо содействия диффузии нелипофильных препаратов через клеточные мембраны, усилители проникновения также повышают проницаемость липофильных препаратов.

Усилители проникновения можно отнести к одной из пяти широких категорий, то есть поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие агенты и нехелатирующие не поверхностно-активные вещества (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92). Каждый из вышеупомянутых классов усилителей проникновения описан ниже более подробно.

Сурфактанты (или «поверхностно-активные вещества») представляют собой химические соединения, которые при растворении в водном растворе снижают поверхностное натяжение раствора или межфазное натяжение между водным раствором и другой жидкостью, в результате чего усиливается абсорбция агентов RNAi через слизистую оболочку. Помимо солей желчных кислот и жирных кислот, эти усилители проникновения включают, например, лаурилсульфат натрия, полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир и полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир) (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002. Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92); и эмульсии перфторхимических соединений, такие как FC-43. Takahashi *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

Различные жирные кислоты и их производные, которые действуют как усилители проникновения, включают, например, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприновую кислоту (н-декановую кислоту), миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, dicaпрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеоил-гас-глицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, 1-монокапрат глицерина, 1-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, их C₁₋₂₀ алкиловые эфиры (например, метиловый, изопропиловый и трет-бутиловый) и их моно- и диглицериды (то есть олеат, лаурат, капрат, миристан, пальмитат, стеарат, линолеат и т.д.) (см., например, Touitou, E., *et al.* *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

Физиологическая роль желчи включает облегчение диспергирования и всасывания липидов и жирорастворимых витаминов (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 in: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., Hardman *et al.* Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). Различные природные соли желчных кислот и их синтетические производные действуют как усилители проникновения. Таким образом, термин «желчные соли» включает любые природные компоненты желчи, а также любые их синтетические производные. Подходящие соли желчных кислот включают, например, холевую кислоту (или ее фармацевтически приемлемую натриевую соль, холат натрия), дегидрохолевую кислоту (дегидрохолат натрия), дезоксихолевую кислоту (дезоксихолат натрия), глюконовую кислоту (глюколат натрия), гликолевую кислоту (гликолат натрия), гликодезоксихолевую кислоту (гликодезоксихолат натрия), таурохолевую кислоту (таурохолат натрия), тауродезоксихолевую кислоту (тауродезоксихолат натрия), хенодезоксихолевую кислоту (хенодезоксихолат натрия), урсодезоксихолевую кислоту (UDCA), тауро-24,25-дигидрофузидат натрия (STDHF), гликодигидрофузидат натрия и полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир ((POE) (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto *et al.*, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583).

Хелатирующие агенты, используемые в связи с настоящим изобретением, могут быть определены как соединения, которые удаляют ионы металлов из раствора путем образования с ними комплексов, в результате чего усиливается абсорбция агентов RNAi через слизистую оболочку. Что касается их применения в качестве усилителей проникновения в настоящем изобретении, хелатирующие агенты имеют дополнительное преимущество, заключающееся в том, что они также служат ингибиторами DNase, поскольку для большинства охарактеризованных DNA-нуклеаз требуется ион двухвалентного металла для катализа, и поэтому они ингибируются хелатирующими агентами (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Подходящие хелатирующие агенты включают, но этим не ограничиваются, динатрийэтилендиаминтетраацетат (EDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат натрия, 5-метоксисалицилат и гомованилат), N-ацильные производные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацилпроизводные бета-дикетоны (енамины) (см., например, Katdare, A. *et al.*, *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur *et al.*, *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

Используемые в настоящем документе нехелатирующие соединения, не являющиеся поверхностно-активными веществами, усиливающие проникновение, могут быть

определены как соединения, которые демонстрируют незначительную активность в качестве хелатирующих агентов или поверхностно-активных веществ, но которые, тем не менее, усиливают абсорбцию агентов RNAi через слизистую оболочку пищеварительного тракта (см., например, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Этот класс усилителей проникновения включает, например, ненасыщенные циклические мочевины, производные 1-алкил- и 1-алкенилазациклоалканона (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92)); и нестероидные противовоспалительные средства, такие как диклофенак натрия, индометацин и фенилбутазон (Yamashita *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

К фармацевтическим и другим композициям по настоящему изобретению также могут быть добавлены агенты, которые усиливают поглощение агентов RNAi на клеточном уровне. Например, также известно, что катионные липиды, такие как липофектин (Junichi *et al.*, патент США № 5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (WO 97/30731), усиливают поглощение dsRNA клетками.

Для усиления проникновения вводимых нуклеиновых кислот можно использовать другие агенты, включая гликоли, такие как этиленгликоль и пропиленгликоль, пирролы, такие как 2-пиррол, азоны и терпены, такие как лимонен и ментон.

vi. Эксципиенты

В отличие от соединения-носителя «фармацевтический носитель» или «эксципиент» представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующий агент или любой другой фармакологически инертный носитель для доставки одной или нескольких нуклеиновых кислот животному. Эксципиент может быть жидким или твердым, и его выбирают с учетом запланированного способа введения, чтобы обеспечить желаемый объем, консистенцию и т. д. при объединении с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Типичные фармацевтические носители включают, но этим не ограничиваются, связывающие агенты (например, прежелатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и т.д.); наполнители (например, лактоза и другие сахара, микрокристаллическая целлюлоза, пектин, желатин, сульфат кальция, этилцеллюлоза, полиакрилаты или гидрофосфат кальция и т.д.); смазывающие вещества (например, стеарат магния, тальк, диоксид кремния, коллоидный диоксид кремния, стеариновая кислота, стеараты металлов, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоли, бензоат натрия, ацетат натрия и т.д.); разрыхлители (например, крахмал, крахмалгликолят натрия и т.д.); и смачивающие агенты (например, лаурилсульфат натрия и т.д.).

Для составления композиций по настоящему изобретению также могут быть использованы фармацевтически приемлемые органические или неорганические эксципиенты, подходящие для непарентерального введения, которые не взаимодействуют неблагоприятно с нуклеиновыми кислотами. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваются ими, воду, растворы солей, спирты,

полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и тому подобное.

Составы для местного введения нуклеиновых кислот могут включать стерильные и нестерильные водные растворы, неводные растворы в обычных растворителях, таких как спирты, или растворы нуклеиновых кислот в жидких или твердых масляных основах. Растворы также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Можно использовать фармацевтически приемлемые органические или неорганические эксципиенты, подходящие для непарентерального введения, которые не вступают в неблагоприятные реакции с нуклеиновыми кислотами.

Подходящие фармацевтически приемлемые эксципиенты включают, но не ограничиваются ими, воду, растворы солей, спирт, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и тому подобное.

vii. Другие компоненты

Композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, обычно встречающиеся в фармацевтических композициях, в пределах их использования, установленных в данной области техники. Так, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные вещества, такие как, например, противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства, или могут содержать дополнительные вещества, пригодные для физического приготовления различных лекарственных форм композиций по настоящему изобретению, такие как красители, ароматизаторы, консерванты, антиоксиданты, замутнители, загустители и стабилизаторы. Однако такие материалы при добавлении не должны чрезмерно мешать биологической активности компонентов композиций по настоящему изобретению. Составы можно стерилизовать и, при желании, смешивать со вспомогательными агентами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими агентами, эмульгаторами, солями для воздействия на осмотическое давление, буферами, красителями, ароматизаторами или ароматическими веществами и тому подобное., которые не взаимодействуют вредным образом с нуклеиновой кислотой(ами) состава.

Водные суспензии могут содержать вещества, повышающие вязкость суспензии, включая, например, натрийкарбоксиметилцеллюлозу, сорбит или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, представленные в описании, включают (а) один или несколько агентов RNAi и (b) один или несколько агентов, которые действуют по механизму, отличному от RNAi, и которые применимы для лечения нейродегенеративного расстройства, связанного с APOE. Примеры таких агентов включают, но не ограничиваются ими, SSRI, венлафаксин, бупропион и атипичные нейролептики.

Токсичность и терапевтическую эффективность таких соединений можно определить стандартными фармацевтическими процедурами на культурах клеток или экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ (доза, смертельная для 50% людей) и ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная у 50% людей). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами является терапевтическим индексом и может быть выражено как отношение LD₅₀/ED₅₀. Соединения, которые проявляют высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными.

Данные, полученные в результате анализов клеточных культур и исследований на животных, могут быть использованы при определении диапазона дозировок для применения у людей. Дозировка композиций, представленных в данном описании, обычно находится в пределах диапазона циркулирующих концентраций, который включает ED₅₀ с небольшой токсичностью или без токсичности. Дозировка может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, используемого в способах, представленных в описании, терапевтически эффективная доза может быть первоначально оценена из анализов клеточных культур. Доза может быть составлена на животных моделях для достижения диапазона концентраций соединения в циркулирующей плазме или, при необходимости, полипептидного продукта целевой последовательности (например, для достижения сниженной концентрации полипептида), который включает IC₅₀ (то есть концентрация испытуемого соединения, при которой достигается полумаксимальное ингибирование симптомов), как определено в клеточной культуре. Такая информация может быть использована для более точного определения полезных доз для человека. Уровни в плазме можно измерить, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение по их введению, как обсуждалось выше, агенты RNAi, представленные в описании, можно вводить в комбинации с другими известными агентами, эффективными при лечении патологических процессов, опосредованных экспрессией нуклеотидных повторов. В любом случае лечащий врач может регулировать количество и время введения агента RNAi на основе результатов, наблюдаемых с использованием стандартных показателей эффективности, известных специалистам в данной области или описанных в настоящем документе.

VIII. Наборы

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к наборам, которые включают подходящий контейнер, содержащий фармацевтический состав соединения siRNA, например, двухцепочечного соединения siRNA или соединения siRNA (например, предшественника, например, более крупного соединения siRNA, которое может подвергаться преобразованию в соединение siRNA или DNA, которая кодирует соединение siRNA, например, двухцепочечное соединение siRNA, или соединение siRNA, или их предшественник). В некоторых вариантах осуществления изобретения отдельные компоненты фармацевтического состава могут быть предоставлены в одном контейнере. В

качестве альтернативы может быть желательным предоставить компоненты фармацевтического состава по отдельности в двух или более контейнерах, например, один контейнер для препарата соединения siRNA и по меньшей мере другой контейнер для соединения-носителя. Набор может быть упакован в несколько различных конфигураций, таких как один или несколько контейнеров в одной коробке. Различные компоненты можно комбинировать, например, в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к набору. Компоненты можно комбинировать в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, например, для приготовления и введения фармацевтической композиции. В набор также может входить устройство доставки.

IX. Способы ингибирования экспрессии АРОЕ

Настоящее изобретение относится также к способам ингибирования экспрессии гена АРОЕ в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с агентом RNAi, например, агентом двухцепочечной RNAi, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии АРОЕ в клетке, тем самым ингибируя экспрессию АРОЕ в клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения преимущественно ингибируется в клетках ЦНС (например, головного мозга). В других вариантах осуществления изобретения АРОЕ преимущественно ингибируется в печени (например, в гепатоцитах). В некоторых вариантах осуществления изобретения АРОЕ ингибируется в клетках ЦНС (например, головного мозга) и в клетках печени (например, гепатоцитах).

В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибируется экспрессия АРОЕ2. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибируется экспрессия АРОЕ3. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибируется экспрессия АРОЕ4. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибируется экспрессия АРОЕ2 и АРОЕ3. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибируется экспрессия АРОЕ2, АРОЕ3 и АРОЕ4. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибируется экспрессия АРОЕ4 и практически не ингибируется экспрессия АРОЕ2 и АРОЕ3, например, экспрессия АРОЕ2 и АРОЕ3 ингибируется не более чем на 10%.

Приведение клетки в контакт с агентом RNAi, например, агентом двухцепочечной RNAi, можно проводить *in vitro* или *in vivo*. Приведение клетки в контакт *in vivo* с агентом RNAi включает приведение в контакт клетки или группы клеток субъекта, например, человека, с агентом RNAi. Также возможны комбинации способов приведения в контакт с клеткой *in vitro* и *in vivo*.

Приведение в контакт с клеткой может быть прямым или косвенным, как обсуждалось выше. Кроме того, приведение в контакт с клеткой может быть осуществлено посредством нацеливающего лиганда, включая любой лиганд, описанный в настоящем документе или известный в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения нацеливающий лиганд представляет собой углеводную группу, например, лиганд GalNAc или любой другой лиганд, который направляет агент RNAi в представляющий интерес сайт.

Термин «ингибирование», как используется в настоящем изобретении, является взаимозаменяемым с терминами «уменьшение», «заглушение», «понижающая регуляция», «подавление» и другими подобными терминами и включает любой уровень ингибирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень ингибирования, например, для агента RNAi по настоящему изобретению, можно оценить в условиях культивирования клеток, например, где клетки в клеточной культуре трансфицируют с помощью липофектаминTM-опосредованной трансфекции при концентрации вблизи клетки 10 нМ или менее, 1 нМ или менее и т. д. Нокдаун данного агента RNAi можно определить путем сравнения предварительно обработанных уровней в клеточной культуре с уровнями после обработки в клеточной культуре, необязательно также сравнивая с клетками, параллельно обработанными скремблированным или другой формой контрольного агента RNAi. Таким образом, нокдаун в клеточной культуре, например, предпочтительно, 50% или более, может быть идентифицирован как показатель того, что произошло «ингибирование» или «снижение», «понижающая регуляция» или «подавление» и т. д. Явно предполагается, что оценка целевых уровней mRNA или кодируемого белка (и, следовательно, степени «ингибирования» и т. д., вызванного агентом RNAi по изобретению также могут быть дана в системах *in vivo* для агентов RNAi по настоящему изобретению в должным образом контролируемых условиях, как описано в данной области.

Фраза «ингибирование экспрессии гена APOE» или «ингибирование экспрессии APOE», как используется в настоящем изобретении, включает ингибирование экспрессии любого гена APOE (такого как, например, ген APOE мыши, ген APOE крысы, ген APOE обезьяны или ген APOE человека), а также вариантов или мутантов гена APOE, которые кодируют белок APOE. Таким образом, ген APOE может быть геном APOE дикого типа, мутантным геном APOE или трансгенным геном APOE в контексте генетически модифицированной клетки, группы клеток или организма.

«Ингибирование экспрессии гена APOE» включает любой уровень ингибирования гена APOE, например, по меньшей мере частичное подавление экспрессии гена APOE, такое как ингибирование по меньшей мере на 20%. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибирование составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, предпочтительно, по меньшей мере 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%; или ниже уровня обнаружения метода анализа.

Экспрессию гена APOE можно оценивать на основе уровня любой переменной, связанной с экспрессией гена APOE, например, уровня mRNA APOE или уровня белка APOE, или, например, уровня отложения амилоида или тау.

Ингибирование можно оценить по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких из этих переменных по сравнению с контрольным уровнем. Контрольный уровень может представлять собой контрольный уровень любого типа, который используется в данной области, например, исходный уровень перед введением

дозы или уровень, определенный на аналогичном субъекте, клетке или образце, которые не подвергались лечению или подвергались лечению контролем (таким как, например, контроль только буфером или контроль неактивным агентом).

В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению, экспрессия гена АРОЕ ингибируется по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, предпочтительно, по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или 95%, или ниже уровня обнаружения анализа. В некоторых вариантах осуществления изобретения способы включают клинически значимое ингибирование экспрессии АРОЕ, например, что продемонстрировано клинически значимым исходом после лечения субъекта средством для снижения экспрессии АРОЕ.

Ингибирование экспрессии гена АРОЕ может проявляться уменьшением количества mRNA, экспрессируемой первой клеткой или группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном от субъекта), в котором АРОЕ ген транскрибируется и который подвергался или подвергался лечению (например, путем контакта клетки или клеток с агентом RNAi по изобретению или путем введения агента RNAi по изобретению субъекту, в котором клетки присутствуют или присутствовали), так что экспрессия гена АРОЕ ингибируется по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичных первой клетке или группе клеток, которые не подвергались или не подвергались такой обработке (контрольные клетки, не обработанные агентом RNAi или не обработанные агентом RNAi, нацеленным на интересующий ген). Степень ингибирования может быть выражена в терминах:

$$\frac{(\text{mRNA в контрольной клетке}) - (\text{mRNA в обработанной клетке})}{(\text{mRNA в контрольной клетке})} \cdot 100\%$$

В других вариантах осуществления изобретения ингибирование экспрессии гена АРОЕ можно оценивать с точки зрения снижения параметра, который функционально связан с экспрессией гена АРОЕ, например, экспрессии белка АРОЕ. Сайленсинг гена АРОЕ можно определить в любой клетке, экспрессирующей АРОЕ, эндогенной или гетерологичной, из экспрессионной конструкции и с помощью любого анализа, известного в данной области.

Ингибирование экспрессии белка АРОЕ может проявляться снижением уровня белка АРОЕ, экспрессируемого клеткой или группой клеток (например, уровня белка, экспрессируемого в образце, полученном от субъекта). Как объяснялось выше, для оценки подавления mRNA ингибирование уровней экспрессии белка в обработанной клетке или группе клеток может быть аналогичным образом выражено в процентах от уровня белка в контрольной клетке или группе клеток.

Контрольная клетка или группа клеток, которую можно использовать для оценки ингибирования экспрессии гена АРОЕ, включает клетку или группу клеток, которые еще не контактировали с агентом RNAi по изобретению. Например, контрольная клетка или группа клеток могут быть получены от отдельного субъекта (например, человека или животного) до лечения субъекта агентом RNAi.

Уровень mRNA APOE, который экспрессируется клеткой или группой клеток, может быть определен с использованием любого известного в данной области метода оценки экспрессии mRNA. В одном варианте осуществления изобретения уровень экспрессии APOE в образце определяют путем обнаружения транскрибируемого полинуклеотида или его части, например, mRNA гена APOE. RNA можно экстрагировать из клеток с использованием методов выделения RNA, включая, например, экстракцию кислотным фенолом/гуанидинизотиоцианатом (RNAzol B; Biogenesis), наборы для получения RNA RNeasy™ (Qiagen®) или PAXgene (PreAnalytix, Switzerland). Типичные форматы анализов, использующих гибридизацию рибонуклеиновой кислоты, включают ядерные анализы, RT-PCR, анализы защиты от RNase, нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ* и микрочиповый анализ. Циркулирующая mRNA APOE может быть обнаружена с использованием способов, описанных в WO 2012/177906, полное содержание которых включено в настоящий документ в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень экспрессии APOE определяют с помощью зонда нуклеиновой кислоты. Термин «зонд», как используется в настоящем изобретении, относится к любой молекуле, которая способна избирательно связываться со специфичной нуклеиновой кислотой или белком APOE или их фрагментом. Зонды могут быть синтезированы специалистом в данной области или получены из соответствующих биологических препаратов. Зонды могут быть специально разработаны для маркировки. Примеры молекул, которые можно использовать в качестве зондов, включают, но не ограничиваются ими, RNA, DNA, белки, антитела и органические молекулы.

Выделенная mRNA может быть использована в анализах гибридизации или амплификации, которые включают, помимо прочего, саузерн- или нозерн-анализ, анализ полимеразной цепной реакции (PCR) и наборы зондов. Один из способов определения уровней mRNA включает приведение в контакт выделенной mRNA с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с mRNA APOE. В одном варианте осуществления изобретения mRNA иммобилизуют на твердой поверхности и приводят в контакт с зондом, например, пропуская выделенную mRNA на агарозный гель и перенося mRNA из геля на мембрану, такую как нитроцеллюлоза. В альтернативном варианте осуществления зонд(ы) иммобилизуют на твердой поверхности, и mRNA контактируют с зондом(ами), например, в матрице генных чипов Affymetrix®. Квалифицированный специалист может легко адаптировать известные способы обнаружения mRNA для использования при определении уровня mRNA APOE.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии APOE в образце включает процесс амплификации нуклеиновой кислоты или обратной транскриптазы (для получения cDNA), например, mRNA в образце, например, с помощью RT-PCR (экспериментальный вариант осуществления, изложенный Mullis, 1987, патент США № 4683202), лигазная цепная реакция (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), самоподдерживающаяся репликация последовательности (Guatelli *et al.* (1990) *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 87:1874-1878), система амплификации транскрипции (Kwoh *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-бета-репликаза (Lizardi *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:1197), репликация по катящемуся кругу (Lizardi *et al.*, Патент США № 5854033 или любой другой способ амплификации нуклеиновых кислот с последующим обнаружением амплифицированных молекул с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области. Эти схемы обнаружения особенно полезны для обнаружения молекул нуклеиновых кислот, если такие молекулы присутствуют в очень небольшом количестве. В конкретных аспектах настоящего изобретения уровень экспрессии APOE определяют с помощью количественной флуорогенной RT-PCR (то есть системы TaqMan™), анализа люциферазы Dual-Glo® или другим признанным в данной области способом измерения экспрессии APOE или уровня mRNA.

Уровень экспрессии mRNA APOE можно отслеживать с помощью мембранного блоттинга (например, используемого в гибридизационном анализе, такого как нозерн, саузерн, дот и тому подобное) или микролунок, пробирок для образцов, гелей, шариков или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанные нуклеиновые кислоты). См. патенты США №№ 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки. Определение уровня экспрессии APOE может также включать использование зондов нуклеиновых кислот в растворе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень экспрессии mRNA экспрессия оценивают с помощью анализов разветвленной DNA (bDNA) или PCR в реальном времени (qPCR). Применение этого способа PCR описано и проиллюстрировано в примерах, представленных в данном документе. Такие способы можно также использовать для обнаружения нуклеиновых кислот APOE.

Уровень экспрессии белка APOE можно определить с использованием любого известного в данной области способа измерения уровней белка. Такие способы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), тонкослойную хроматографию (ТСХ), гипердиффузионную хроматографию, жидкостные или гелевые реакции преципитации, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (простую или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммунофлуоресцентный анализ, электрохемилюминесцентный анализ и тому подобное. Такие анализы можно также использовать для обнаружения белков, указывающих на присутствие или репликацию белков APOE.

В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность способов по настоящему изобретению при лечении заболевания, связанного с APOE, оценивают по снижению уровня mRNA APOE (например, путем оценки уровня APOE в образце спинномозговой жидкости, с помощью биопсии головного мозга или иным образом).

В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность способов по настоящему изобретению при лечении заболевания, связанного с APOE, оценивают по

снижению уровня mRNA APOE (например, путем оценки уровня APOE в образце печени, с помощью биопсии или иным образом).

В некоторых вариантах осуществления изобретения способов по настоящему изобретению агент RNAi вводят субъекту таким образом, что агент RNAi доставляется в конкретный участок внутри субъекта. Ингибирование экспрессии APOE можно оценить с помощью измерений уровня или изменения уровня mRNA APOE или белка APOE в образце, полученном из определенного участка тела субъекта, например, клеток ЦНС. В некоторых вариантах осуществления способы включают клинически значимое ингибирование экспрессии APOE, например, что продемонстрировано клинически значимым исходом после лечения субъекта средством для снижения экспрессии APOE.

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

Х. Способы лечения или предупреждения APOE-ассоциированных нейродегенеративных заболеваний

В настоящем изобретении предложены также способы применения агента RNAi по изобретению или композиции, содержащей агент RNAi по изобретению, для снижения или ингибирования экспрессии APOE в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с dsRNA по изобретению и выдерживание клетки в течение времени, достаточного для деградации транскрипта mRNA гена APOE, тем самым ингибируя экспрессию гена APOE в клетке. Снижение экспрессии генов можно оценить любыми способами, известными в данной области. Например, снижение экспрессии APOE может быть определено путем определения уровня экспрессии mRNA APOE с использованием способов, обычных для специалиста в данной области, например, нозерн-блоттинга, qRT-PCR; путем определения уровня белка APOE с использованием способов, обычных для обычного специалиста в данной области, таких как вестерн-блоттинг, иммунологические способы.

В способах по настоящему изобретению клетка может контактировать *in vitro* или *in vivo*, то есть клетка может находиться внутри субъекта.

Клеткой, подходящей для лечения с использованием способов по настоящему изобретению, может быть любая клетка, которая экспрессирует ген APOE. Клеткой, пригодной для использования в способах по настоящему изобретению, может быть клетка млекопитающего, например, клетка примата (такая как клетка человека или клетка примата, отличного от человека, например, клетка обезьяны или клетка шимпанзе), клетка примата (такая как клетка крысы или клетка мыши. В одном варианте осуществления изобретения клетка представляет собой клетку человека, например, клетку ЦНС человека. В одном варианте осуществления изобретения клетка представляет собой клетку человека,

например, клетку печени человека. В одном варианте осуществления изобретения клетка представляет собой клетку человека, например, клетку ЦНС человека и клетку печени человека.

Экспрессия APOE ингибируется в клетке по меньшей мере примерно на около 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или около 100%, то есть ниже уровня обнаружения. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения экспрессия APOE ингибируется по меньшей мере на 50%.

Способы *in vivo* по настоящему изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей агент RNAi, где агент RNAi включает нуклеотидную последовательность, комплементарную по меньшей мере части RNA-транскрипта гена APOE млекопитающего, подлежащего лечению. Когда организмом, подлежащим лечению, является млекопитающим, таким как человек, композицию можно вводить любым способом, известным в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, пероральный, внутривентриальный или парентеральный пути, включая внутримозговой (например, внутримозговой, интрапаренхиматозный и интратекальный), внутривенный, внутримышечный, интравитреальный, подкожный, чрескожный, воздушный (аэрозольный), назальный, ректальный и местный (включая трансбуккальный и сублингвальный) введение. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции вводят путем подкожной инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции вводят путем подкожной инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции вводят путем интратекальной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение осуществляется посредством инъекции депо. Инъекция депо может высвобождать агент RNAi постоянным образом в течение длительного периода времени. Таким образом, инъекция депо может снизить частоту дозирования, необходимую для получения желаемого эффекта, например, желаемого ингибирования APOE или терапевтического или профилактического эффекта. Инъекция депо также может обеспечить более стабильные концентрации в сыворотке. Инъекции депо могут включать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения инъекция депо представляет собой подкожную инъекцию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение осуществляется через помпу. Помпа может быть внешней помпой или помпой, имплантированной хирургическим путем. В некоторых вариантах осуществления изобретения насос представляет собой подкожно имплантированный осмотический насос. В других вариантах осуществления изобретения насос представляет собой инфузионный насос. Инфузионный насос можно использовать для внутримозговых, внутривенных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения инфузионный насос представляет собой подкожный инфузионный насос. В других вариантах осуществления изобретения помпа представляет собой имплантированную хирургическим путем помпу, которая доставляет агент RNAi в ЦНС.

Способ введения может быть выбран в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение, и в зависимости от обрабатываемой области. Путь и место введения могут быть выбраны для улучшения нацеливания.

В одном аспекте настоящее изобретение относится также к способам ингибирования экспрессии гена APOE у млекопитающего. Способы включают введение млекопитающему композиции, содержащей двухцепочечную RNA, нацеленную на ген APOE в клетке млекопитающего, и выдерживание млекопитающего в течение времени, достаточного для деградации транскрипта mRNA гена APOE, тем самым ингибируя экспрессию гена APOE в клетке. Снижение экспрессии гена можно оценить любыми способами, известными в данной области техники, а также способами, например, qRT-PCR, описанным в настоящем документе. Снижение продукции белка можно оценить любыми способами, известными в данной области техники, а также способами, например, ELISA, описанным в настоящем документе. В одном варианте осуществления образец биопсии ЦНС или образец спинномозговой жидкости (CSF) служат в качестве тканевого материала для мониторинга снижения экспрессии гена или белка APOE (или, следовательно, его заместителей).

Настоящее изобретение дополнительно относится к способам лечения нуждающегося в этом субъекта. Способы лечения согласно настоящему изобретению включают введение агента RNAi по изобретению лечения нуждающегося в этом субъекта. Способы лечения согласно настоящему изобретению включают введение агента RNAi, нацеленного на ген APOE, или фармацевтической композиции, содержащей агент RNAi, нацеленный на ген APOE.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены способы предупреждения, лечения или ингибирования нейродегенеративного заболевания или расстройства, связанного с APOE, такого как амилоид- β -опосредованного заболевания, например, болезни Альцгеймера, синдрома Дауна и церебральной амилоидной ангиопатии, или тау-опосредованного заболевания, например, первичной таупатии, такой как лобно-височная деменция (FTD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кордикобазальная дегенерация (CBD), болезнь Пика (PiD), глобулярные глиальные таупатии (GGT), лобно-височная деменция с паркинсонизмом (FTDP, FTDP-17), хроническая травматическая энцеопатия (СТЕ), кулачная деменция, лобно-височная долевая дегенерация (FTLD), аргирофильная зерновая болезнь (AGD) и первичная возрастная таупатия (PART) или вторичная таупатия, например, AD, болезнь Крейцфельда-Якоба, синдром Дауна и семейная британская деменция.

Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества любого агента RNAi, например, агентов dsRNA, или фармацевтической композиции, предложенной в настоящем документе, тем самым предотвращая, излечивая или ингибируя прогрессирование APOE-ассоциированного нейродегенеративного заболевания или расстройства у субъекта.

Агент RNAi по изобретению можно вводить как «агент свободной RNAi». Агент свободной RNAi вводят в отсутствие фармацевтической композиции. Агент «голой» RNAi

может находиться в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может содержать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат, или любую их комбинацию. В одном варианте осуществления изобретения буферный раствор представляет собой забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). pH и осмолярность буферного раствора, содержащего агент RNAi, может регулировать таким образом, чтобы он подходил для введения субъекту.

Альтернативно, агент RNAi по изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, такой как липосомальная композиция dsRNA.

Субъекты, для которых было бы эффективно снижение или ингибирование экспрессии гена APOE, являются пациентами, имеющими APOE-ассоциированное нейродегенеративное заболевание.

Изобретение дополнительно относится к способам применения агента RNAi или его фармацевтической композиции, например, для лечения субъекта, для которого было бы полезно снижение или ингибирование экспрессии APOE, например, субъекта, страдающего APOE-ассоциированным нейродегенеративным заболеванием, в комбинации с другими фармацевтическими препаратами или другими терапевтическими методами, например, с известными фармацевтическими препаратами или известными терапевтическими методами, такими как, например, те, которые в настоящее время применяются для лечения этих нарушений. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения агент RNAi, нацеленный на APOE, вводят в комбинации, например, с агентом, пригодным для лечения APOE-ассоциированного нейродегенеративного заболевания, описанного в других разделах настоящего документа или известного в данной области. Например, дополнительные агенты, подходящие для лечения субъекта, у которого было бы полезно уменьшить экспрессию APOE, например субъекта, страдающего APOE-ассоциированным нейродегенеративным заболеванием, могут включать агенты, используемые в настоящее время для лечения симптомов APOE. Агент RNAi и дополнительные терапевтические агенты можно вводить одновременно или в одной и той же комбинации, например, интратекально, или дополнительный терапевтический агент можно вводить как часть отдельной композиции, или в разное время, или другим способом, известным в данной области или описанными в настоящем документе.

В одном варианте осуществления изобретения способ включает введение композиции, представленной в настоящем документе, таким образом, что экспрессия целевого гена APOE снижается в течение по меньшей мере одного месяца. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения экспрессия снижается по крайней мере в течение 2 месяцев, 3 месяцев или 6 месяцев.

Предпочтительно, агенты RNAi, применимые для способов и композиций, представленных в настоящем документе, конкретно нацелены на RNA (первичные или полученные) гена-мишени APOE. Композиции и способы ингибирования экспрессии этих генов с использованием RNAi можно приготовить и осуществить, как описано в настоящем документе.

Введение dsRNA в соответствии со способами по настоящему изобретению может привести к уменьшению тяжести, признаков, симптомов или маркеров таких заболеваний или нарушений у пациента с АРОЕ-ассоциированным нейродегенеративным заболеванием. Под «снижением» в данном контексте подразумевается статистически значимое или клинически значимое снижение такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или около 100%.

Эффективность лечения или профилактики заболевания можно оценить, например, путем измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптомов, уменьшения боли, качества жизни, дозы лекарственного средства, необходимой для поддержания эффекта лечения, уровня маркера заболевания или любого другого измеримого параметра, подходящего для данного заболевания, подвергаемого лечению или предназначенного для его предупреждения. Специалист в данной области вполне может контролировать эффективность лечения или профилактики путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. Например, эффективность лечения АРОЕ-ассоциированного нейродегенеративного заболевания можно оценить, например, путем периодического мониторинга познания, обучения и/или памяти субъекта. Сравнение более поздних показаний с первоначальными показаниями дает врачу представление об эффективности лечения. Специалист в данной области вполне может контролировать эффективность лечения или предупреждения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. В связи с введением агента RNAi, нацеленного на АРОЕ, или его фармацевтической композиции, выражение «эффективный против» АРОЕ-ассоциированного нейродегенеративного заболевания означает, что введение клинически приемлемым образом приводит к благоприятному эффекту, по крайней мере, у статистически значимой части пациентов, такому как улучшение симптомов, излечение, снижение заболеваемости, продление жизни, улучшение качества жизни или другой эффект, обычно признанный положительным врачами, знакомыми с лечением АРОЕ-ассоциированных нейродегенеративных заболеваний и связанных с ними причин.

Лечебный или предупреждающий эффект очевиден, когда имеет место статистически значимое улучшение одного или нескольких параметров состояния болезни или отсутствие ухудшения или развития симптомов, которые в противном случае можно было бы ожидать. Например, благоприятное изменение измеримого параметра заболевания не менее чем на 10%, предпочтительно, не менее чем на 20, 30, 40, 50% или более может свидетельствовать об эффективном лечении. Эффективность данного лекарственного средства или состава этого лекарственного средства на основе агента RNAi также можно оценить с использованием экспериментальной модели на животных для данного заболевания, как известно в данной области. При использовании экспериментальной модели на животных эффективность лечения подтверждается, когда наблюдается статистически значимое снижение маркера или симптома.

Альтернативно, эффективность может быть измерена по снижению тяжести заболевания, как это определено специалистом в области диагностики на основании клинически принятой шкалы оценки тяжести заболевания. Любое положительное изменение, приводящее, например, к уменьшению тяжести заболевания, измеренному с использованием соответствующей шкалы, представляет собой адекватное лечение с использованием агента RNAi или состава с агентом RNAi, описанного в настоящем документе.

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

Агент RNAi можно вводить интратекально, путем интравитреальной инъекции или путем внутривенной инфузии в течение определенного периода времени на регулярной основе. В некоторых вариантах осуществления изобретения после начальной схемы лечения лечение можно проводить реже. Введение агента RNAi может снизить уровни APOE, например, в клетке, ткани, крови, образце спинномозговой жидкости или другом компартменте пациента по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на около 99% или более. В предпочтительном варианте осуществления изобретения введение агента RNAi может снизить уровни APOE, например, в клетке, ткани, крови, образце спинномозговой жидкости или другом компартменте пациента по меньшей мере на 50%.

Перед введением полной дозы агента RNAi пациентам можно вводить меньшую дозу, такую как реакция на инфузию 5%, и контролировать побочные эффекты, такие как аллергическая реакция. В другом примере у пациента можно наблюдать на предмет нежелательных иммуностимулирующих эффектов, таких как повышенные уровни цитокинов (например, TNF-альфа или INF-альфа).

Альтернативно, агент RNAi можно вводить подкожно, то есть посредством подкожной инъекции. Для доставки субъекту желаемой, например, ежемесячной дозы агента RNAi можно использовать одну или несколько инъекций. Инъекции можно повторять в течение определенного периода времени. Введение можно повторять на регулярной основе. В некоторых вариантах осуществления после начальной схемы лечения лечение можно проводить реже. Режим повторных доз может включать введение терапевтического количества агента RNAi на регулярной основе, например, ежемесячно или до одного раза в квартал, два раза в год, один раз в год. В некоторых вариантах осуществления изобретения агент RNAi вводят примерно от одного раза в месяц до около одного раза в квартал (то есть примерно раз в три месяца).

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится данное изобретение. Хотя способы и вещества, аналогичные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем документе, могут использоваться на практике или при тестировании агентов RNAi и способов, представленных в изобретении, подходящие способы и вещества описаны ниже. Все публикации, патентные заявки,

патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящем документе, полностью включены в качестве ссылки. В случае противоречия настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры носят исключительно иллюстративный характер и не предназначены для ограничения.

Неофициальный перечень последовательностей прилагается к настоящему документу и является частью представленной спецификации.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Дизайн агента RNAi, синтез, отбор и оценка *in vitro*

В этом примере описаны способы конструирования, синтеза, отбора и оценки *in vitro* агентов APOE RNAi.

Источник реагентов

Если источник реагента конкретно не указан в настоящем документе, такой реагент может быть получен от любого поставщика реагентов для молекулярной биологии со стандартом качества/чистоты для применения в молекулярной биологии.

Данные биоинформатики

Набор siRNA, нацеленных на человеческий аполипопротеин E (APOE; человеческий NCBI refseqID NM_000041.4; NCBI GeneID: 348), был разработан с использованием пользовательских сценариев R и Python. mRNA человека NM_000041 REFSEQ, версия 4, имеет длину 1166 нуклеотидов.

Одиночные цепи и дуплексы APOE получали с использованием обычных способов, известных в данной области. Подробный список последовательностей немодифицированных смысловых и антисмысловых цепей APOE показан в таблицах 2 и 4, а подробный список последовательностей модифицированных смысловых и антисмысловых цепей APOE показан в таблицах 3 и 5.

В таблице 7 представлен подробный список немодифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи APOE тех агентов из таблицы 2, которые нацелены на патогенный аллель APOE4, а в таблице 8 представлен подробный список последовательностей модифицированной смысловой и антисмысловой цепи APOE тех агентов в таблице 3, которые нацеливаются на патогенный аллель APOE4.

Синтез siRNA

siRNA синтезировали и отжигали с использованием обычных методов, известных в данной области. Вкратце, последовательности siRNA синтезировали в масштабе 1 мкмоль с использованием синтезатора Mermade 192 (BioAutomation) с фосфорамидитными химическими веществами на твердых носителях. Твердая подложка представляла собой стекло с контролируемыми порами (500-1000 Å), загруженное специальным лигандом GalNAc (конъюгаты 3'-GalNAc), универсальной твердой подложкой (AM Chemicals) или первым представляющим интерес нуклеотидом. Вспомогательные реагенты для синтеза и стандартные мономеры 2-цианоэтилфосфорамидита (2'-дезоксид-2'-фтор, 2'-О-метил, RNA, DNA) были получены от компании Thermo-Fisher (Milwaukee, WI), Hongene (China) или Chemgenes (Wilmington, MA, USA). Дополнительные фосфорамидитные мономеры были

закуплены у коммерческих поставщиков, приготовлены собственными силами или закуплены с использованием индивидуального синтеза у различных СМО. Фосфорамидиты готовили в концентрации 100 мМ либо в ацетонитриле, либо в смеси ацетонитрил:ДМФА 9:1 и связывали с использованием 5-этилтио-1Н-тетразола (ЕТТ, 0,25 М в ацетонитриле) со временем реакции 400 с. Фосфоротиоатные связи были созданы с использованием 100 мМ раствора 3-((диметиламинометилиден)амино)-3Н-1,2,4-дитиазол-3-тиона (DDTT, полученного от компании Chemgenes (Wilmington, MA, USA)) в безводном ацетонитрил/пиридин (9:1 по объему). Время окисления 5 минут. Все последовательности были синтезированы с окончательным удалением группы DMT («DMT-Off»).

Фосфоротиоатные связи были созданы с использованием 100 мМ раствора 3-((диметиламинометилиден)амино)-3Н-1,2,4-дитиазол-3-тиона (DDTT, полученного от Chemgenes (Wilmington, MA, USA)) в безводном ацетонитрил/пиридин (9:1 по объему). Время окисления 5 минут. Все последовательности были синтезированы с окончательным удалением группы DMT («DMT-Off»). Для последовательностей, содержащих любые природные рибонуклеотидные связи (2'-ОН), защищенные трет-бутилдиметилсилильной (TBDMS) группой, вторую стадию снятия защиты проводили с использованием TEA·3HF (триэтиламинтригидрофторид). К каждому раствору олигонуклеотида в водном метиламине добавляли 200 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и 300 мкл TEA·3HF, и раствор инкубировали в течение приблизительно 30 минут при 60°C. После инкубации планшету давали нагреться до комнатной температуры и неочищенные олигонуклеотиды осаждали добавлением 1 мл смеси 9:1 ацетонтрила:этанола или 1:1 этанола:изопропанола. Затем планшеты центрифугировали при температуре 4°C в течение 45 мин и надосадочную жидкость осторожно декантировали с помощью многоканальной пипетки. Осадок олигонуклеотида ресуспендировали в 20 мМ NaOAc и затем обессоливали с использованием колонки для исключения размера HiTrap (5 мл, GE Healthcare) в системе Agilent LC, оснащенной автоматическим пробоотборником, УФ-детектором, измерителем проводимости и коллектором фракций. Обессоленные образцы собирали в 96-луночные планшеты, а затем анализировали с помощью ЖХ-МС и УФ-спектрометрии для подтверждения идентичности и количественного определения количества вещества, соответственно.

Дуплексирование одиночных цепей выполняли на роботе для работы с жидкостями Tecan. Смысловые и антисмысловые одиночные цепи объединяли в эквимольном соотношении до конечной концентрации 10 мкМ в 1х PBS в 96-луночных планшетах, планшет герметизировали, инкубировали при 100°C в течение 10 минут, а затем медленно возвращали к комнатной температуре в течение период 2-3 часа. Концентрацию и идентичность каждого дуплекса подтверждали, а затем использовали для скрининговых анализов *in vitro*.

Культура клеток и трансфекции

Клетки трансфицировали путем добавления 4,9 мкл Opti-MEM плюс 0,1 мкл RNAiMAX на лунку (Invitrogen, Carlsbad CA, кат. № 13778-150) к 5 мкл дуплексов siRNA

на лунку с 4 повторами каждого дуплекса siRNA в 96 -луночный планшет и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем к смеси siRNA добавляли сорок мкл среды, содержащей $\sim 1,5 \times 10^4$ клеток. Клетки инкубировали в течение 24 часов перед очисткой RNA. Эксперименты проводились при 10 нМ. Эксперименты по трансфекции проводят в клетках гепатомы человека Hep3B (ATCC HB-8064) с помощью EMEM (каталог ATCC № 30-2003).

Выделение общей RNA с использованием набора для выделения mRNA DYNABEADS

RNA выделяли с использованием автоматизированного протокола на платформе BioTek-EL406 с использованием DYNABEAD (Invitrogen, кат. № 61012). Вкратце, в планшет с клетками добавляли 70 мкл лизирующего/связывающего буфера и 10 мкл лизирующего буфера, содержащего 3 мкл магнитных шариков. Планшеты инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 минут при комнатной температуре, затем собирали магнитные шарики и удаляли супернатант. Связанную с шариками RNA затем промывали 2 раза 150 мкл промывочного буфера А и один раз промывочным буфером В. Затем шарики промывали 150 мкл элюирующего буфера, повторно собирали и удаляли надосадочную жидкость.

Синтез cDNA с использованием набора для обратной транскрипции cDNA высокой емкости ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, № по каталогу 4368813)

Десять мкл мастер-микса, содержащего 1 мкл 10X буфера, 0,4 мкл 25X dNTP, 1 мкл 10x случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора RNase и 6,6 мкл H₂O на реакцию, добавляли к RNA, выделенной выше. Планшеты запечатывали, перемешивали и инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 минут при комнатной температуре, а затем инкубировали в течение 2 часов при 37°C.

PCR в реальном времени

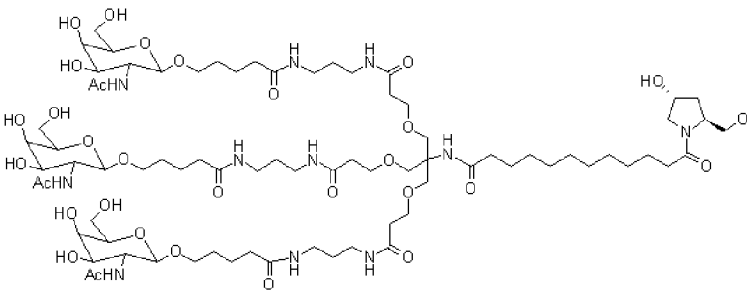
Два мкл cDNA добавляли к мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл человеческого или мышиного зонда GAPDH TaqMan (ThermoFisher № по каталогу 4352934E или 4351309) и 0,5 мкл соответствующего зонда APOE (коммерчески доступного, например, от компании Thermo Fisher) и 5 мкл мастер-микса зонда Lightcycler 480 (Roche № по каталогу 04887301001) на лунку в 384-луночных планшетах (Roche № по каталогу 04887301001). PCR в реальном времени проводили в системе LightCycler480 Real Time PCR (Roche). Каждая дуплекс тестировали с N=4, и данные нормализовали к клеткам, трансфицированным нецелевой контрольной siRNA. Для расчета относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ и нормализовали к анализам, проведенным с клетками, трансфицированными нецелевой контрольной siRNA.

Результаты скрининга однократной дозы в клетках Hep3B с агентами из таблицы 5 представлены в таблице 6.

Таблица 1. Аббревиатуры нуклеотидных мономеров, используемые в представлении последовательностей нуклеиновых кислот. Понятно, что эти мономеры, когда они присутствуют в олигонуклеотиде, взаимно связаны 5'-3'-фосфодиэфирными

связями, и понятно, что когда нуклеотид содержит модификацию 2'-фтор, то фтор заменяет гидроксигруппу в этом положении в исходном нуклеотиде (то есть это 2'-дезоксигуанозин-2'-фторнуклеотид).

Аббревиатура	Нуклеотид(ы)
A	Аденозин-3'-фосфат
Ab	бета-L-аденозин-3'-фосфат
Abs	бета-L-аденозин-3'-фосфоротиоат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-фтораденозин-3'-фосфоротиоат
As	аденозин-3'-фосфоротиоат
C	цитидин-3'-фосфат
Cb	бета-L-цитидин-3'-фосфат
Cbs	бета-L-цитидин-3'-фосфоротиоат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфоротиоат
Cs	цитидин-3'-фосфоротиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gb	бета-L-гуанозин-3'-фосфат
Gbs	бета-L-гуанозин-3'-фосфоротиоат
Gf	2'-фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-фторгуанозин-3'-фосфоротиоат
Gs	гуанозин-3'-фосфоротиоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
Ts	5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
U	Уридин-3'-фосфат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин-3'-фосфоротиоат
Us	уридин-3'-фосфоротиоат
N	любой нуклеотид, модифицированный или немодифицированный
a	2'-О-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-О-метиладенозин-3'-фосфоротиоат
c	2'-О-метилцитидин-3'-фосфат

cs	2'-О-метилцитидин-3'-фосфоротиоат
g	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфоротиоат
t	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфоротиоат
s	фосфоротиоатная связь
L96	N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканоил)]-4-гидроксипролинол Нур-(GalNAc-алкил)3  $C_{78}H_{138}N_{11}O_{31}$ Exact Mass: 1724.9560 Mol. Wt.: 1725.9854
Y34	2-гидроксиметил-тетрагидрофуран-4-метокси-3-фосфат (абазическая 2'-ОМе фураноза)
Y44	инвертированная абазическая DNA (2-гидроксиметил-тетрагидрофуран-5-фосфат)
(Agn)	Аденозин-гликолевая нуклеиновая кислота (GNA)
(Cgn)	Цитидин-гликолевая нуклеиновая кислота (GNA)
(Ggn)	Гуанозин-гликолевая нуклеиновая кислота (GNA)
(Tgn)	Тимидин-гликолевая нуклеиновая кислота (GNA) S-изомер
P	Фосфат
VP	Винил-фосфонат
(Aam)	2'-О-(N-метилацетамид)аденозин-3'-фосфат
(Aams)	2'-О-(N-метилацетамид)аденозин-3'-фосфоротиоат
(Gam)	2'-О-(N-метилацетамид)гуанозин-3'-фосфат
(Gams)	2'-О-(N-метилацетамид)гуанозин-3'-фосфоротиоат
(Tam)	2'-О-(N-метилацетамид)тимидин-3'-фосфат
(Tams)	2'-О-(N-метилацетамид)тимидин-3'-фосфоротиоат
dA	2'-деоксиаденозин-3'-фосфат

dAs	2'-деоксиаденозин-3'-фосфоротиаат
dC	2'-деоксицитидин-3'-фосфат
dCs	2'-деоксицитидин-3'-фосфоротиаат
dG	2'-деоксигуанозин-3'-фосфат
dGs	2'-деоксигуанозин-3'-фосфоротиаат
dT	2'-деокситимидин-3'-фосфат
dTs	2'-деокситимидин-3'-фосфоротиаат
dU	2'-деоксиуридин
dUs	2'-деоксиуридин-3'-фосфоротиаат
(Aeo)	2'-О-метоксиэтиладенозин-3'-фосфат
(Aeos)	2'-О-метоксиэтиладенозин-3'-фосфоротиаат
(Geo)	2'-О-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфат
(Geos)	2'-О-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфоротиаат
(Teo)	2'-О-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфат
(Teos)	2'-О-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфоротиаат
(m5Ceo)	2'-О-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфат
(m5Ceos)	2'-О-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфоротиаат
(A3m)	3'-О-метиладенозин-2'-фосфат
(A3mx)	3'-О-метил-ксилофуранозиладенозин-2'-фосфат
(G3m)	3'-О-метилгуанозин-2'-фосфат
(G3mx)	3'-О-метил-ксилофуранозилгуанозин-2'-фосфат
(C3m)	3'-О-метилцитидин-2'-фосфат
(C3mx)	3'-О-метил-ксилофуранозилцитидин-2'-фосфат
(U3m)	3'-О-метилуридин-2'-фосфат
U3mx)	3'-О-метил-ксилофуранозилуридин-2'-фосфат
(m5Cam)	2'-О-(N-метилацетамид)-5-метилцитидин-3'-фосфат
(m5Cams)	2'-О-(N-метилацетамид)-5-метилцитидин-3'-фосфоротиаат
(Chd)	2'-О-гексадецил-цитидин-3'-фосфат
(Chds)	2'-О-гексадецил-цитидин-3'-фосфоротиаат
(Uhd)	2'-О-гексадецил-уридин-3'-фосфат
(Uhds)	2'-О-гексадецил-уридин-3'-фосфоротиаат
(pshe)	Гидроксиэтилфосфоротиаат

Таблица 2. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи АРОЕ

Смысловая последовательность от 5' до 3'	SE Q ID NO:	Антисмысловая последовательность от 5' до 3'	SE Q ID NO:	Мишенимый участок смысловой цепи в NM_000041.4	Мишенимый участок антисмысловой цепи в NM_000041.4
GGCCAAUCACAGGCAGGA AGU	15	ACUUCCUGCCUGUGAUUUGGC CAG	150	NM_000041.4_50- 70_A21U_s	NM_000041.4_48- 70_U1A_as
CAGGCAGGAAGAUGAAGG UUU	16	AAACCUUCAUCUCCUGCCU GUG	151	NM_000041.4_59- 79_C21U_s	NM_000041.4_57- 79_G1A_as
AGGAAGAUGAAGGUUCUG UGU	17	ACACAGAACCUUCAUCUCC UGC	152	NM_000041.4_64- 84_G21U_s	NM_000041.4_62- 84_C1A_as
AUGAAGGUUCUGUGGGCU GCU	18	AGCAGCCCACAGAACCUUCA UCU	153	NM_000041.4_70- 90_G21U_s	NM_000041.4_68- 90_C1A_as
UUCUGUGGGCUGCGUUGC UGU	19	ACAGCAACGCAGCCCACAGA ACC	154	NM_000041.4_77- 97_G21U_s	NM_000041.4_75- 97_C1A_as
UGGGCUGCGUUGCUGGUC ACU	20	AGUGACCAGCAACGCAGCCC ACA	155	NM_000041.4_82- 102_A21U_s	NM_000041.4_80- 102_U1A_as
GCGUUGCUGGUCACAUUC CUU	21	AAGGAAUGUGACCAGCAACG CAG	156	NM_000041.4_88- 108_G21U_s	NM_000041.4_86- 108_C1A_as
GCUGGUCACAUUCCUGGC AGU	22	ACUGCCAGGAAUGUGACCAG CAA	157	NM_000041.4_93- 113_G21U_s	NM_000041.4_91- 113_C1A_as
UCACAUUCCUGGCAGGAU GCU	23	AGCAUCCUGCCAGGAAUGUG ACC	158	NM_000041.4_98- 118_C21U_s	NM_000041.4_96- 118_G1A_as

UGGCAGGAUGCCAGGCCA AGU	24	ACUUGGCCUGGCAUCCUGCC AGG	159	NM_000041.4_107- 127_G21U_s	NM_000041.4_105- 127_C1A_as
CAGGCCAAGGUGGAGCAA GCU	25	AGCUUGCUCACCUCUUGGCCU GGC	160	NM_000041.4_118- 138_G21U_s	NM_000041.4_116- 138_C1A_as
AAGGUGGAGCAAGCGGUG GAU	26	AUCCACCGCUUGCUCACCUCU UGG	161	NM_000041.4_124- 144_G21U_s	NM_000041.4_122- 144_C1A_as
CAAGCGGUGGAGACAGAG CCU	27	AGGCUCUGUCUCCACCGCUU GCU	162	NM_000041.4_133- 153_G21U_s	NM_000041.4_131- 153_C1A_as
GGUGGAGACAGAGCCGGA GCU	28	AGCUCCGGCUCUGUCUCCAC CGC	163	NM_000041.4_138- 158_C21U_s	NM_000041.4_136- 158_G1A_as
CCCGAGCUGCGCCAGCAG ACU	29	AGUCUGCUGGCGCAGCUCGG GCU	164	NM_000041.4_157- 177_C21U_s	NM_000041.4_155- 177_G1A_as
GCUGCGCCAGCAGACCGA GUU	30	AACUCGGUCUGCUGGCGCAG CUC	165	NM_000041.4_162- 182_G21U_s	NM_000041.4_160- 182_C1A_as
CCAGCAGACCGAGUGGCA GAU	31	AUCUGCCACUCGGUCUGCUG GCG	166	NM_000041.4_168- 188_G21U_s	NM_000041.4_166- 188_C1A_as
CAGCGCUGGGAACUGGCA CUU	32	AAGUGCCAGUUCCCAGCGCU GGC	167	NM_000041.4_193- 213_G21U_s	NM_000041.4_191- 213_C1A_as
CUGGGAACUGGCACUGGG UCU	33	AGACCCAGUGCCAGUUCCCA GCG	168	NM_000041.4_198- 218_G21U_s	NM_000041.4_196- 218_C1A_as
AACUGGCACUGGGUCGCU UUU	34	AAAAGCGACCCAGUGCCAGU UCC	169	NM_000041.4_203-223_s	NM_000041.4_201-223_as

CACUGGGUCGCUUUUGGG AUU	35	AAUCCCAAAAGCGACCCAGU GCC	170	NM_000041.4_209-229_s	NM_000041.4_207-229_as
GUCGCUUUUGGGAUUACC UGU	36	ACAGGUAAUCCCAAAAGCGA CCC	171	NM_000041.4_215- 235_C21U_s	NM_000041.4_213- 235_G1A_as
UUUUGGGAUUACCUGCGC UGU	37	ACAGCGCAGGUAAUCCCAAA AGC	172	NM_000041.4_220- 240_G21U_s	NM_000041.4_218- 240_C1A_as
CUGCGCUGGGUGCAGACA CUU	38	AAGUGUCUGCACCCAGCGCA GGU	173	NM_000041.4_232- 252_G21U_s	NM_000041.4_230- 252_C1A_as
UGGGUGCAGACACUGUCU GAU	39	AUCAGACAGUGUCUGCACCC AGC	174	NM_000041.4_238- 258_G21U_s	NM_000041.4_236- 258_C1A_as
CAGACACUGUCUGAGCAG GUU	40	AACCUGCUCAGACAGUGUCU GCA	175	NM_000041.4_244- 264_G21U_s	NM_000041.4_242- 264_C1A_as
CAGGAGGAGCUGCUCAGC UCU	41	AGAGCUGAGCAGCUCCUCCU GCA	176	NM_000041.4_265- 285_C21U_s	NM_000041.4_263- 285_G1A_as
CUGCUCAGCUCCCAGGUC ACU	42	AGUGACCUGGGAGCUGAGCA GCU	177	NM_000041.4_274- 294_C21U_s	NM_000041.4_272- 294_G1A_as
UCCCAGGUCACCCAGGAA CUU	43	AAGUUCCUGGGUGACCUGGG AGC	178	NM_000041.4_283- 303_G21U_s	NM_000041.4_281- 303_C1A_as
ACCCAGGAACUGAGGGCG CUU	44	AAGCGCCCUCAGUUCCUGGG UGA	179	NM_000041.4_292- 312_G21U_s	NM_000041.4_290- 312_C1A_as
UGAGGGCGCUGAUGGACG AGU	45	ACUCGUCCAUCAGCGCCCUC AGU	180	NM_000041.4_302- 322_A21U_s	NM_000041.4_300- 322_U1A_as

GCGCUGAUGGACGAGACC AUU	46	AAUGGUCUCGUCCAUCAGCG CCC	181	NM_000041.4_307- 327_G21U_s	NM_000041.4_305- 327_C1A_as
GACGAGACCAUGAAGGAG UUU	47	AAACUCCUUCAUGGUCUCGU CCA	182	NM_000041.4_316- 336_G21U_s	NM_000041.4_314- 336_C1A_as
ACCAUGAAGGAGUUGAAG GCU	48	AGCCUUCAACUCCUUCAUGG UCU	183	NM_000041.4_322- 342_C21U_s	NM_000041.4_320- 342_G1A_as
GGAGUUGAAGGCCUACAA AUU	49	AAUUUGUAGGCCUUCAACUC CUU	184	NM_000041.4_330- 350_C21U_s	NM_000041.4_328- 350_G1A_as
AAGGCCUACAAAUCGGAA CUU	50	AAGUUCCGAUUUGUAGGCCU UCA	185	NM_000041.4_337- 357_G21U_s	NM_000041.4_335- 357_C1A_as
ACAAAUCGGAACUGGAGG AAU	51	AUUCCUCCAGUUCCGAUUUG UAG	186	NM_000041.4_344- 364_C21U_s	NM_000041.4_342- 364_G1A_as
UCGGAACUGGAGGAACAA CUU	52	AAGUUGUUCCUCCAGUUCCG AUU	187	NM_000041.4_349- 369_G21U_s	NM_000041.4_347- 369_C1A_as
GAGGAACAACUGACCCCG GUU	53	AACCGGGGUCAGUUGUCCU CCA	188	NM_000041.4_358- 378_G21U_s	NM_000041.4_356- 378_C1A_as
CGCGGGCACGGCUGUCCA AGU	54	ACUUGGACAGCCGUGCCCGC GUC	189	NM_000041.4_389- 409_G21U_s	NM_000041.4_387- 409_C1A_as
GCACGGCUGUCCAAGGAG CUU	55	AAGCUCCUUGGACAGCCGUG CCC	190	NM_000041.4_394- 414_G21U_s	NM_000041.4_392- 414_C1A_as
GCUGUCCAAGGAGCUGCA GGU	56	ACCUGCAGCUCCUUGGACAG CCG	191	NM_000041.4_399- 419_C21U_s	NM_000041.4_397- 419_G1A_as

GCCCGGCUGGGCGCGGAC AUU	57	AAUGUCCGCGCCCAGCCGGG CCU	192	NM_000041.4_427- 447_G21U_s	NM_000041.4_425- 447_C1A_as
CUGGGCGCGGACAUGGAG GAU	58	AUCCUCCAUGUCCGCGCCCA GCC	193	NM_000041.4_433- 453_C21U_s	NM_000041.4_431- 453_G1A_as
CGCGGACAUGGAGGACGU GCU	59	AGCACGUCCUCCAUGUCCGC GCC	194	NM_000041.4_438- 458_U20C_G21U_s	NM_000041.4_436- 458_C1A_A2G_as
GCGGACAUGGAGGACGUG UGU	60	ACACACGUCCUCCAUGUCCG CGC	195	NM_000041.4_439- 459_C21U_s	NM_000041.4_437- 459_G1A_as
GCGGACAUGGAGGACGUG CGU	61	ACGCACGUCCUCCAUGUCCG CGC	196	NM_000041.4_439- 459_U19C_C21U_s	NM_000041.4_437- 459_G1A_A3G_as
CGGACAUGGAGGACGUGC GCU	62	AGCGCACGUCCUCCAUGUCC GCG	197	NM_000041.4_440- 460_U18C_G21U_s	NM_000041.4_438- 460_C1A_A4G_as
GGACAUGGAGGACGUGCG CGU	63	ACGCGCACGUCCUCCAUGUC CGC	198	NM_000041.4_441- 461_U17C_G21U_s	NM_000041.4_439- 461_C1A_A5G_as
GACAUGGAGGACGUGCGC GGU	64	ACCGCGCACGUCCUCCAUGU CCG	199	NM_000041.4_442- 462_U16C_C21U_s	NM_000041.4_440- 462_G1A_A6G_as
ACAUGGAGGACGUGCGCG GCU	65	AGCCGCGCACGUCCUCCAUG UCC	200	NM_000041.4_443- 463_U15C_C21U_s	NM_000041.4_441- 463_G1A_A7G_as
CAUGGAGGACGUGCGCGG CCU	66	AGGCCGCGCACGUCCUCCA GUC	201	NM_000041.4_444- 464_U14C_G21U_s	NM_000041.4_442- 464_C1A_A8G_as
AUGGAGGACGUGCGCGGC CGU	67	ACGGCCGCGCACGUCCUCCA UGU	202	NM_000041.4_445- 465_U13C_C21U_s	NM_000041.4_443- 465_G1A_A9G_as

UGGAGGACGUGCGCGGCC GCU	68	AGCGGCCGCGCACGUCCUCC AUG	203	NM_000041.4_446- 466_U12C_C21U_s	NM_000041.4_444- 466_G1A_A10G_as
GGAGGACGUGCGCGGCCG CCU	69	AGGCGGCCGCGCACGUCCUC CAU	204	NM_000041.4_447- 467_U11C_s	NM_000041.4_445- 467_A11G_as
GAGGACGUGCGCGGCCGC CUU	70	AAGGCGGCCGCGCACGUCCU CCA	205	NM_000041.4_448- 468_U10C_G21U_s	NM_000041.4_446- 468_C1A_A12G_as
AGGACGUGCGCGGCCGCC UGU	71	ACAGGCGGCCGCGCACGUCC UCC	206	NM_000041.4_449- 469_U9C_G21U_s	NM_000041.4_447- 469_C1A_A13G_as
GGACGUGCGCGGCCGCCU GGU	72	ACCAGGCGGCCGCGCACGUC CUC	207	NM_000041.4_450- 470_U8C_s	NM_000041.4_448- 470_A14G_as
GACGUGCGCGGCCGCCUG GUU	73	AACCAGGCGGCCGCGCACGU CCU	208	NM_000041.4_451- 471_U7C_G21U_s	NM_000041.4_449- 471_C1A_A15G_as
ACGUGCGCGGCCGCCUGG UGU	74	ACACCAGGCGGCCGCGCACG UCC	209	NM_000041.4_452- 472_U6C_C21U_s	NM_000041.4_450- 472_G1A_A16G_as
CGUGCGCGGCCGCCUGGU GCU	75	AGCACCAGGCGGCCGCGCAC GUC	210	NM_000041.4_453- 473_U5C_A21U_s	NM_000041.4_451- 473_U1A_A17G_as
GUGCGCGGCCGCCUGGUG CAU	76	AUGCACCAGGCGGCCGCGCA CGU	211	NM_000041.4_454- 474_U4C_G21U_s	NM_000041.4_452- 474_C1A_A18G_as
GCGGCCGCCUGGUGCAGU ACU	77	AGUACUGCACCAGGCGGCCG CAC	212	NM_000041.4_458- 478_C21U_s	NM_000041.4_456- 478_G1A_as
CGCCUGGUGCAGUACCGC GGU	78	ACCGCGGUACUGCACCAGGC GGC	213	NM_000041.4_463- 483_C21U_s	NM_000041.4_461- 483_G1A_as

GAGGUGCAGGCCAUGCUC GGU	79	ACCGAGCAUGGCCUGCACCU CGC	214	NM_000041.4_484- 504_C21U_s	NM_000041.4_482- 504_G1A_as
GCCAUGCUCGGCCAGAGC ACU	80	AGUGCUCUGGCCGAGCAUGG CCU	215	NM_000041.4_493- 513_C21U_s	NM_000041.4_491- 513_G1A_as
GGCCAGAGCACCGAGGAG CUU	81	AAGCUCCUCGGUGCUCUGGC CGA	216	NM_000041.4_502- 522_G21U_s	NM_000041.4_500- 522_C1A_as
GCUGCGGGUGCGCCUCGC CUU	82	AAGGCGAGGCGCACCCGCAG CUC	217	NM_000041.4_519- 539_C21U_s	NM_000041.4_517- 539_G1A_as
GUGCGCCUCGCCUCCCACC UU	83	AAGGUGGGAGGCGAGGCGCA CCC	218	NM_000041.4_526- 546_G21U_s	NM_000041.4_524- 546_C1A_as
CGCCUCCCACCUGCGCAAG CU	84	AGCUUGCGCAGGUGGGAGGC GAG	219	NM_000041.4_534-554_s	NM_000041.4_532-554_as
CCCACCUGCGCAAGCUGCG UU	85	AACGCAGCUUGCGCAGGUGG GAG	220	NM_000041.4_539- 559_A21U_s	NM_000041.4_537- 559_U1A_as
CUGCGCAAGCUGCGUAAG CGU	86	ACGCUUACGCAGCUUGCGCA GGU	221	NM_000041.4_544- 564_G21U_s	NM_000041.4_542- 564_C1A_as
AAGCUGCGUAAGCGGCUC CUU	87	AAGGAGCCGCUUACGCAGCU UGC	222	NM_000041.4_550- 570_C21U_s	NM_000041.4_548- 570_G1A_as
GUAAGCGGCUCCUCCGCG AUU	88	AAUCGCGGAGGAGCCGCUUA CGC	223	NM_000041.4_557- 577_G21U_s	NM_000041.4_555- 577_C1A_as
GGCUCCUCCGCGAUGCCG AUU	89	AAUCGGCAUCGCGGAGGAGC CGC	224	NM_000041.4_563- 583_G21U_s	NM_000041.4_561- 583_C1A_as

CUCCGCGAUGCCGAUGAC CUU	90	AAGGUCAUCGGCAUCGCGGA GGA	225	NM_000041.4_568- 588_G21U_s	NM_000041.4_566- 588_C1A_as
GAUGCCGAUGACCUGCAG AAU	91	AUUCUGCAGGUCAUCGGCAU CGC	226	NM_000041.4_574- 594_G21U_s	NM_000041.4_572- 594_C1A_as
GAUGACCUGCAGAAGCGC CUU	92	AAGGCGCUUCUGCAGGUCAU CGG	227	NM_000041.4_580- 600_G21U_s	NM_000041.4_578- 600_C1A_as
CUGCAGAAGCGCCUGGCA GUU	93	AACUGCCAGGCGCUUCUGCA GGU	228	NM_000041.4_586- 606_G21U_s	NM_000041.4_584- 606_C1A_as
AAGCGCCUGGCAGUGUAC CAU	94	AUGGUACACUGCCAGGCGCU UCU	229	NM_000041.4_592- 612_G21U_s	NM_000041.4_590- 612_C1A_as
CUGGCAGUGUACCAGGCC GGU	95	ACCGGCCUGGUACACUGCCA GGC	230	NM_000041.4_598- 618_G21U_s	NM_000041.4_596- 618_C1A_as
GAGCGCGGCCUCAGCGCC AUU	96	AAUGGCGCUGAGGCCGCGCU CGG	231	NM_000041.4_634- 654_C21U_s	NM_000041.4_632- 654_G1A_as
CGGCCUCAGCGCCAUCCGC GU	97	ACGCGGAUGGCGCUGAGGCC GCG	232	NM_000041.4_639- 659_A21U_s	NM_000041.4_637- 659_U1A_as
AGCGCCAUCCGCGAGCGCC UU	98	AAGGCGCUCGCGGAUGGCGC UGA	233	NM_000041.4_646- 666_G21U_s	NM_000041.4_644- 666_C1A_as
UGGGGCCCCUGGUGGAAC AGU	99	ACUGUUCCACCAGGGGCCCC AGG	234	NM_000041.4_665- 685_G21U_s	NM_000041.4_663- 685_C1A_as
CCCCUGGUGGAACAGGGC CGU	100	ACGGCCCUGUUCCACCAGGG GCC	235	NM_000041.4_670- 690_C21U_s	NM_000041.4_668- 690_G1A_as

CGCGUGCGGGCCGCCACU GUU	101	AACAGUGGCGGCCCCGCACGC GGC	236	NM_000041.4_688- 708_G21U_s	NM_000041.4_686- 708_C1A_as
GCCGCCACUGUGGGCUCCC UU	102	AAGGGAGCCCACAGUGGCGG CCC	237	NM_000041.4_697- 717_G21U_s	NM_000041.4_695- 717_C1A_as
CCUGGCCGGCCAGCCGCUA CU	103	AGUAGCGGCUGGCCGGCCAG GGA	238	NM_000041.4_714- 734_A21U_s	NM_000041.4_712- 734_U1A_as
GGCCAGCCGCUACAGGAG CGU	104	ACGCUCCUGUAGCGGCUGGC CGG	239	NM_000041.4_721- 741_G21U_s	NM_000041.4_719- 741_C1A_as
GCCGCUACAGGAGCGGGC CCU	105	AGGGCCCGCUCCUGUAGCGG CUG	240	NM_000041.4_726- 746_A21U_s	NM_000041.4_724- 746_U1A_as
GCGCGGAUGGAGGAGAUG GGU	106	ACCCAUCUCCUCCAUCCGCG CGC	241	NM_000041.4_769- 789_C21U_s	NM_000041.4_767- 789_G1A_as
CGCGACCGCCUGGACGAG GUU	107	AACCUCGUCCAGGCGGUCGC GGG	242	NM_000041.4_799- 819_G21U_s	NM_000041.4_797- 819_C1A_as
GCCUGGACGAGGUGAAGG AGU	108	ACUCCUUCACCUCGUCCAGG CGG	243	NM_000041.4_806- 826_C21U_s	NM_000041.4_804- 826_G1A_as
GACGAGGUGAAGGAGCAG GUU	109	AACCUGCUCCUUCACCUCGU CCA	244	NM_000041.4_811- 831_G21U_s	NM_000041.4_809- 831_C1A_as
GGAGGUGCGCGCCAAGCU GGU	110	ACCAGCUUGGCGCGCACCUC CGC	245	NM_000041.4_834- 854_A21U_s	NM_000041.4_832- 854_U1A_as
CGCGCCAAGCUGGAGGAG CAU	111	AUGCUCUCCAGCUUGGCGC GCA	246	NM_000041.4_841- 861_G21U_s	NM_000041.4_839- 861_C1A_as

CAGGCCCAGCAGAUACGC CUU	112	AAGGCGUAUCUGCUGGGCCU GCU	247	NM_000041.4_859- 879_G21U_s	NM_000041.4_857- 879_C1A_as
CCAGCAGAUACGCCUGCA GGU	113	ACCUGCAGGCGUAUCUGCUG GGC	248	NM_000041.4_864- 884_C21U_s	NM_000041.4_862- 884_G1A_as
CGCCUGCAGGCCGAGGCC UUU	114	AAAGGCCUCGGCCUGCAGGC GUA	249	NM_000041.4_874- 894_C21U_s	NM_000041.4_872- 894_G1A_as
GCAGGCCGAGGCCUCCA GGU	115	ACCUGGAAGGCCUCGGCCUG CAG	250	NM_000041.4_879- 899_C21U_s	NM_000041.4_877- 899_G1A_as
CCGAGGCCUCCAGGCCCG CU	116	AGCGGGCCUGGAAGGCCUCG GCC	251	NM_000041.4_884- 904_C21U_s	NM_000041.4_882- 904_G1A_as
GCCUCCAGGCCCGCCUCA AU	117	AUUGAGGCGGGCCUGGAAGG CCU	252	NM_000041.4_889- 909_G21U_s	NM_000041.4_887- 909_C1A_as
CCAGGCCCGCCUCAAGAGC UU	118	AAGCUCUUGAGGCGGGCCUG GAA	253	NM_000041.4_894- 914_G21U_s	NM_000041.4_892- 914_C1A_as
CCGCCUCAAGAGCUGGUU CGU	119	ACGAACCAGCUCUUGAGGCG GGC	254	NM_000041.4_900- 920_A21U_s	NM_000041.4_898- 920_U1A_as
CAAGAGCUGGUUCGAGCC CCU	120	AGGGGCUCGAACCAGCUCUU GAG	255	NM_000041.4_906-926_s	NM_000041.4_904-926_as
AGCCCCUGGUGGAAGACA UGU	121	ACAUGUCUCCACCAGGGGC UCG	256	NM_000041.4_920- 940_C21U_s	NM_000041.4_918- 940_G1A_as
CUGGUGGAAGACAUGCAG CGU	122	ACGCUGCAUGUCUCCACCA GGG	257	NM_000041.4_925- 945_C21U_s	NM_000041.4_923- 945_G1A_as

GGAAGACAUGCAGCGCCA GUU	123	AACUGGCGCUGCAUGUCUUC CAC	258	NM_000041.4_930- 950_G21U_s	NM_000041.4_928- 950_C1A_as
GCCGGGCUUGGUGGAGAAG GUU	124	AACCUUCUCCACCAGCCCGG CCC	259	NM_000041.4_952- 972_G21U_s	NM_000041.4_950- 972_C1A_as
GCUGGUGGAGAAGGUGCA GGU	125	ACCUGCACCUUCUCCACCAG CCC	260	NM_000041.4_957- 977_C21U_s	NM_000041.4_955- 977_G1A_as
ACCAGCGCCGCCCCUGUGC CU	126	AGGCACAGGGGCGGCGCUGG UGC	261	NM_000041.4_988- 1008_C21U_s	NM_000041.4_986- 1008_G1A_as
GCCCCUGUGCCCAGCGACA AU	127	AUUGUCGCUGGGCACAGGGG CGG	262	NM_000041.4_997- 1017_s	NM_000041.4_995-1017_as
UGUGCCCAGCGACAAUCA CUU	128	AAGUGAUUGUCGCUGGGCAC AGG	263	NM_000041.4_1002- 1022_G21U_s	NM_000041.4_1000- 1022_C1A_as
CAGCGACAAUCACUGAAC GCU	129	AGCGUUCAGUGAUUGUCGCU GGG	264	NM_000041.4_1008- 1028_C21U_s	NM_000041.4_1006- 1028_G1A_as
CAAUCACUGAACGCCGAA GCU	130	AGCUUCGGCGUUCAGUGAUU GUC	265	NM_000041.4_1014- 1034_C21U_s	NM_000041.4_1012- 1034_G1A_as
ACUGAACGCCGAAGCCUG CAU	131	AUGCAGGCUUCGGCGUUCAG UGA	266	NM_000041.4_1019- 1039_G21U_s	NM_000041.4_1017- 1039_C1A_as
ACGCCGAAGCCUGCAGCC AUU	132	AAUGGCUGCAGGCUUCGGCG UUC	267	NM_000041.4_1024- 1044_G21U_s	NM_000041.4_1022- 1044_C1A_as
GAAGCCUGCAGCCAUGCG ACU	133	AGUCGCAUGGCUGCAGGCUU CGG	268	NM_000041.4_1029- 1049_C21U_s	NM_000041.4_1027- 1049_G1A_as

UGCAGCCAUGCGACCCAC GU	134	ACGUGGGGUCGCAUGGCUGC AGG	269	NM_000041.4_1035- 1055_C21U_s	NM_000041.4_1033- 1055_G1A_as
GCGACCCACGCCACCCCG UU	135	AACGGGGUGGCGUGGGGUCG CAU	270	NM_000041.4_1044- 1064_G21U_s	NM_000041.4_1042- 1064_C1A_as
CCCACGCCACCCCGUGCCU CU	136	AGAGGCACGGGGUGGCGUGG GGU	271	NM_000041.4_1049- 1069_C21U_s	NM_000041.4_1047- 1069_G1A_as
CCACCCCGUGCCUCCUGCC UU	137	AAGGCAGGAGGCACGGGGUG GCG	272	NM_000041.4_1055- 1075_C21U_s	NM_000041.4_1053- 1075_G1A_as
CGUGCCUCCUGCCUCCGCG CU	138	AGCGCGGAGGCAGGAGGCAC GGG	273	NM_000041.4_1061- 1081_A21U_s	NM_000041.4_1059- 1081_U1A_as
CUCCUGCCUCCGCGCAGCC UU	139	AAGGCUGCGCGGAGGCAGGA GGC	274	NM_000041.4_1066- 1086_G21U_s	NM_000041.4_1064- 1086_C1A_as
GCCUCCGCGCAGCCUGCAG CU	140	AGCUGCAGGCUGCGCGGAGG CAG	275	NM_000041.4_1071- 1091_G21U_s	NM_000041.4_1069- 1091_C1A_as
CCUGUCCCCGCCCCAGCCG UU	141	AACGGCUGGGGCGGGGACAG GGU	276	NM_000041.4_1098- 1118_C21U_s	NM_000041.4_1096- 1118_G1A_as
CCCGCCCCAGCCGUCCUCC UU	142	AAGGAGGACGGCUGGGGCGG GGA	277	NM_000041.4_1104- 1124_G21U_s	NM_000041.4_1102- 1124_C1A_as
CCCAGCCGUCCUCCUGGGG UU	143	AACCCCAGGAGGACGGCUGG GGC	278	NM_000041.4_1109- 1129_G21U_s	NM_000041.4_1107- 1129_C1A_as
UCCUGGGGUGGACCCUAG UUU	144	AAACUAGGGUCCACCCAGG AGG	279	NM_000041.4_1120- 1140_s	NM_000041.4_1118- 1140_as

GGGUGGACCCUAGUUUAA UAU	145	AUAUUAACUAGGGUCCACC CCA	280	NM_000041.4_1125- 1145_A21U_s	NM_000041.4_1123- 1145_U1A_as
GACCCUAGUUUAAUAAAG AUU	146	AAUCUUUAUUAACUAGGGU CCA	281	NM_000041.4_1130- 1150_s	NM_000041.4_1128- 1150_as
UAGUUUAAUAAAGAUUCA CCU	147	AGGUGAAUCUUUAUUAACU AGG	282	NM_000041.4_1135- 1155_A21U_s	NM_000041.4_1133- 1155_U1A_as
UAAUAAAGAUUCACCAAG UUU	148	AAACUUGGUGAAUCUUUAU AAA	283	NM_000041.4_1140- 1160_s	NM_000041.4_1138- 1160_as
AGAUUCACCAAGUUUCAC GCU	149	AGCGUGAAACUUGGUGAAUC UUU	284	NM_000041.4_1146- 1166_A21U_s	NM_000041.4_1144- 1166_U1A_as

Таблица 3. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи АРОЕ

Смысловая последовательность от 5' до 3'	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность от 5' до 3'	SEQ ID NO:	Мишеневая последовательность mRNA от 5' до 3'	SEQ ID NO:
gsgsccaaUfcAfCfAfggcaggaaguL96	285	asCfsuucCfuGfCfcuguGfaUfuggccsasg	420	CTGGCCAATCACAGGCAG GAAGA	555
csasggcaGfgAfAfGfaugaagguuuL96	286	asAfsaccUfuCfAfucuuCfcUfgccugsusg	421	CACAGGCAGGAAGATGA AGGTTC	556
asgsaagAfuGfAfAfgguucuguguL96	287	asCfsacaGfaAfCfcuucAfuCfuuccusgsc	422	GCAGGAAGATGAAGGTT CTGTGG	557
asusgaagGfuUfCfUfgugggcugcuL96	288	asGfscagCfcCfAfcagaAfcCfucauscsu	423	AGATGAAGGTTCTGTGGG CTGCG	558

ususcuguGfgGfCfUfgcguugcuguL96	289	asCfsagcAfaCfGfcagcCfcAfcagaascsc	424	GGTTCTGTGGGCTGCGTT GCTGG	559
usgsggcuGfcGfUfUfgcuggucacuL96	290	asGfsugaCfcAfGfcaacGfcAfgcccascsa	425	TGTGGGCTGCGTTGCTGG TCACA	560
gscsguugCfuGfGfUfcacauuccuuL96	291	asAfsngaAfuGfUfgaccAfgCfaacgcsasg	426	CTGCGTTGCTGGTCACAT TCCTG	561
gscsugguCfaCfAfUfuccuggcaguL96	292	asCfsugcCfaGfGfaaugUfgAfccagcsasa	427	TTGCTGGTCACATTCCTG GCAGG	562
uscsacauUfcCfUfGfgcaggaugcuL96	293	asGfscauCfcUfGfccagGfaAfugugascs	428	GGTCACATTCCTGGCAGG ATGCC	563
usgsgcagGfaUfGfCfcaggccaaguL96	294	asCfsuugGfcCfUfggcaUfcCfugccasgsg	429	CCTGGCAGGATGCCAGGC CAAGG	564
csasggccAfaGfGfUfggagcaagcuL96	295	asGfscuuGfcUfCfcaccUfuGfgccugsgsc	430	GCCAGGCCAAGGTGGAG CAAGCG	565
asasggugGfaGfCfAfagcgguggauL96	296	asUfsccaCfcGfCfuugcUfcCfaccuusgsg	431	CCAAGGTGGAGCAAGCG GTGGAG	566
csasagcgGfuGfGfAfgacagagccuL96	297	asGfsgcuCfuGfUfcuccAfcCfnguugscsu	432	AGCAAGCGGTGGAGACA GAGCCG	567
gsgsuggaGfaCfAfGfagccggagcuL96	298	asGfscucCfgGfCfucugUfcUfccaccsgsc	433	GCGGTGGAGACAGAGCC GGAGCC	568
cscscgagCfuGfCfGfccagcagacuL96	299	asGfsucuGfcUfGfgcgcAfgCfucgggscsu	434	AGCCCGAGCTGCGCCAGC AGACC	569

gscsugcgCfcAfGfCfagaccgaguuL96	300	asAfsucGfgUfCfugcuGfgCfgcagsusc	435	GAGCTGCGCCAGCAGAC CGAGTG	570
cscsagcaGfaCfCfGfaguggcagauL96	301	asUfscugCfcAfCfucggUfcUfgcuggscsg	436	CGCCAGCAGACCGAGTG GCAGAG	571
csasgcgcUfgGfGfAfacuggcacuuL96	302	asAfsugCfcAfGfuuccCfaGfcgcugsgsc	437	GCCAGCGCTGGGAACTG GCACTG	572
csusgggaAfcUfGfGfcacugggucuL96	303	asGfsaccCfaGfUfgccaGfuUfcccagscsg	438	CGCTGGGAACTGGCACTG GGTCG	573
asascuggCfaCfUfGfggucgcuuuuL96	304	asAfsaagCfgAfCfccagUfgCfcaguuscsc	439	GGAAGTGGCACTGGGTCG CTTTT	574
csascuggGfuCfGfCfuuuugggauuL96	305	asAfsuccCfaAfAfagcgAfcCfcagugscsc	440	GGCACTGGGTCGCTTTTG GGATT	575
gsuscgcuUfuUfGfGfgauuaccuguL96	306	asCfsaggUfaAfUfccaAfaAfgcgacscsc	441	GGGTCGCTTTTGGGATTA CCTGC	576
ususuuggGfaUfUfAfccugcgcuguL96	307	asCfsagcGfcAfGfguaaUfcCfcaaaasgsc	442	GCTTTTGGGATTACCTGC GCTGG	577
csusgcgcUfgGfGfUfgcagacacuuL96	308	asAfsugUfcUfGfcaccCfaGfcgcagsgsu	443	ACCTGCGCTGGGTGCAGA CACTG	578
usgsggugCfaGfAfCfacugucugauL96	309	asUfscagAfcAfGfugucUfgCfaccasgsc	444	GCTGGGTGCAGACACTGT CTGAG	579
csasgacaCfuGfUfCfugagcagguuL96	310	asAfsccuGfcUfCfagacAfgUfgucugscsa	445	TGCAGACACTGTCTGAGC AGGTG	580

csasggagGfaGfCfUfgcucagcucuL96	311	asGfsagcUfgAfGfcagcUfcCfuccugscsa	446	TGCAGGAGGAGCTGCTCA GCTCC	581
csusgcucAfgCfUfCfccaggucacuL96	312	asGfsugaCfcUfGfggagCfuGfagcagscsu	447	AGCTGCTCAGCTCCCAGG TCACC	582
uscscagGfuCfAfCfccaggaacuuL96	313	asAfsguuCfcUfGfggugAfcCfugggasgsc	448	GCTCCCAGGTCACCCAGG AACTG	583
ascscagGfaAfCfUfgagggcgcuuL96	314	asAfsagcCfcCfUfcaguUfcCfugggusgsa	449	TCACCCAGGAAGTGGAGG GCGCTG	584
usgsagggCfcCfUfGfauggacaguuL96	315	asCfsucgUfcCfAfucagCfcCfccucagsu	450	ACTGAGGGCGCTGATGG ACGAGA	585
gscsgcugAfuGfGfAfcgagaccuuL96	316	asAfsuggUfcUfCfguccAfuCfagcgscsc	451	GGGCGCTGATGGACGAG ACCATG	586
gsascgagAfcCfAfUfgaaggaguuuL96	317	asAfsacuCfcUfUfcaugGfuCfucgucscsa	452	TGGACGAGACCATGAAG GAGTTG	587
ascscagAfaGfGfAfguugaaggcuL96	318	asGfsccuUfcAfAfcuccUfuCfaugguscsu	453	AGACCATGAAGGAGTTG AAGGCC	588
gsgsaguuGfaAfGfGfccuacaaauuL96	319	asAfsuuuGfuAfGfgccuUfcAfacuccsusu	454	AAGGAGTTGAAGGCCTA CAAATC	589
asasggccUfaCfAfAfaucggaacuuL96	320	asAfsguuCfcGfAfuugUfaGfgccuuscsa	455	TGAAGGCCTACAAATCGG AACTG	590
ascsaauCfcGfAfAfcuggaggaauL96	321	asUfsuccUfcCfAfguucCfcAfuugusag	456	CTACAAATCGGAAGTGA GGAAC	591

uscsggaaCfuGfGfAfpgaacaacuuL96	322	asAfsguuGfuUfCfcuccAfgUfuccgasusu	457	AATCGGAACTGGAGGAA CAACTG	592
gsasggaaCfaAfCfUfgaccccgguuL96	323	asAfsccgGfgGfUfcaguUfgUfuccucscsa	458	TGGAGGAACAACCTGACC CCGGTG	593
csgscgggCfaCfGfGfcuguccaaguL96	324	asCfsuugGfaCfAfgccgUfgCfccgcgsusc	459	GACGCGGGCACGGCTGTC CAAGG	594
gscsacggCfuGfUfCfcaaggagcuuL96	325	asAfsgcuCfcUfUfggacAfgCfcgugcscsc	460	GGGCACGGCTGTCCAAG GAGCTG	595
gscsugucCfaAfGfGfagcugcagguL96	326	asCfscugCfaGfCfuccuUfgGfacagcscsg	461	CGGCTGTCCAAGGAGCTG CAGGC	596
gscscggCfuGfGfGfcgcggacauuL96	327	asAfsuguCfcGfCfccccAfgCfcgggcscsu	462	AGGCCCGGCTGGGCGCG GACATG	597
csusgggcGfcGfGfAfcauggaggauL96	328	asUfscuCfcAfUfguccGfcGfcccagcscsc	463	GGCTGGGCGCGGACATG GAGGAC	598
csgscggaCfaUfGfGfaggacgugcuL96	329	asGfscacGfuCfCfuccaUfgUfccgcgscsc	464	GGCGCGGACATGGAGGA CGTGCG	599
gscsggacAfuGfGfAfggacguguguL96	330	asCfsacaCfGfUfCfcuccAfuGfuccgcsgsc	465	GCGCGGACATGGAGGAC GTGTGC	600
gscsggacAfuGfGfAfggacgugcguL96	331	asCfsgcaCfGfUfCfcuccAfuGfuccgcsgsc	466	GCGCGGACATGGAGGAC GTGCGC	601
csgsgacaUfgGfAfGfagcugcgcguL96	332	asGfscgcAfcGfUfccucCfaUfguccgscsg	467	CGCGGACATGGAGGACG TGCGCG	602

gsgsacauGfgAfGfGfacgugcgcgL96	333	asCfsgcgCfaCfGfuccuCfcAfuguccsgsc	468	GCGGACATGGAGGACGT GCGCGG	603
gsascaugGfaGfGfAfcgugcgcgguL96	334	asCfscgcGfcAfCfguccUfcCfaugucscsg	469	CGGACATGGAGGACGTG CGCGGC	604
ascsauggAfgGfAfCfGugcgcgguL96	335	asGfscgcCfGfAfCfGucCfuCfcauguscsc	470	GGACATGGAGGACGTGC GCGGCC	605
csasuggaGfgAfCfGfGfcgugcgcgguL96	336	asGfsgccGfcGfCfGfcacuCfcUfcaugsusc	471	GACATGGAGGACGTGCG CGGCCG	606
asusggagGfaCfGfUfgcgcgcgguL96	337	asCfsggcCfGfGfcacGfCfuccausgsu	472	ACATGGAGGACGTGCGC GGCCGC	607
usgsgaggAfcGfUfGfcgcgcgguL96	338	asGfscggCfcGfCfGfcacGfuCfcuccasug	473	CATGGAGGACGTGCGCG GCCGCC	608
gsgsaggaCfGfUfGfCfGcgcgcgguL96	339	asGfsgcgGfcCfGfGfcacCfGfucccsasu	474	ATGGAGGACGTGCGCGG CCGCCT	609
gsasggacGfuGfCfGfcgcgcgguL96	340	asAfsggcGfgCfCfGfcacAfcGfuccucsa	475	TGGAGGACGTGCGCGGC CGCCTG	610
asgsgacgUfgCfGfCfGcgcgcgguL96	341	asCfsaggCfGfCfGfcgcCfaCfguccuscsc	476	GGAGGACGTGCGCGGCC GCCTGG	611
gsgsacguGfcGfCfGfcgcgcgguL96	342	asCfscagGfcGfGfcgcGfcAfCguccsusc	477	GAGGACGTGCGCGGCCG CCTGGT	612
gsascgugCfGfCfGfGfcgcgcgguL96	343	asAfscgaGfgCfGfGfcgcCfGfGfcgucscsu	478	AGGACGTGCGCGGCCGC CTGGTG	613

ascsgugcGfcGfGfCfcgccugguguL96	344	asCfsaccAfgGfCfggccGfcGfcacguscsc	479	GGACGTGCGCGGCCGCCT GGTGC	614
csgsugcgCfgGfCfCfgccuggugcuL96	345	asGfscacCfaGfGfcggcCfGcGfcacgsusc	480	GACGTGCGCGGCCGCCTG GTGCA	615
gsusgcgcGfgCfCfGfcuggugcauL96	346	asUfsgcaCfcAfGfGcgGcCfcGfcgcacsgsu	481	ACGTGCGCGGCCGCCTGG TGCAG	616
gscsggccGfcCfUfGfgugcaguacuL96	347	asGfsuacUfgCfAfccagGfcGfgccgcsasc	482	GTGCGGCCGCCTGGTGCA GTACC	617
csgsccugGfuGfCfAfguaccgcgguL96	348	asCfscgcGfgUfAfcugcAfcCfaggcgsgsc	483	GCCGCCTGGTGCA GTACC GCGGC	618
gsasggugCfaGfGfCfcaugcucgguL96	349	asCfscgaGfcAfUfggccUfgCfaccucsgsc	484	GCGAGGTGCAGGCCATG CTCGGC	619
gscscaugCfuCfGfGfccagagcacuL96	350	asGfsugcUfcUfGfgccgAfgCfauggcscsu	485	AGGCCATGCTCGGCCAGA GCACC	620
gsgsccagAfgCfAfCfcgaggagcuuL96	351	asAfsghuGfcUfCfGgugCfuCfuggccsgsa	486	TCGGCCAGAGCACCGAG GAGCTG	621
gscsugcgGfgUfGfCfGCCucgcuuL96	352	asAfsggcGfaGfGfcgaCfcCfGcagcsusc	487	GAGCTGCGGGTGCGCCTC GCCTC	622
gsusgcgcCfuCfGfCfcuccaccuuL96	353	asAfsghuGfgGfAfggcgAfgGfcgcacscsc	488	GGGTGCGCCTCGCCTCCC ACCTG	623
csgsccucCfcAfCfCfugcgcaagcuL96	354	asGfscuuGfcGfCfagguGfgGfaggcgcsasg	489	CTCGCCTCCACCTGCGC AAGCT	624

cscscaccUfgCfGfCfaagcugcguuL96	355	asAfsccgCfGfCfUfugcgCfaGfgugggsasg	490	CTCCACCTGCGCAAGCT GCGTA	625
csusgcgcAfaGfCfUfgcguaagcguL96	356	asCfsgcuUfaCfGfcagcUfuGfcgcagsgsu	491	ACCTGCGCAAGCTGCGTA AGCGG	626
asasgcugCfgUfAfAfgcgccuccuuL96	357	asAfsccaGfcCfGfcuuCfGfagcuusgsc	492	GCAAGCTGCGTAAGCGG CTCCTC	627
gsusaagcGfgCfUfCfcuccgcgauuL96	358	asAfsucgCfgGfAfggagCfcGfcuuacsgsc	493	GCGTAAGCGGCTCCTCCG CGATG	628
gsgscuccUfcCfGfCfGaugccgauuL96	359	asAfsucgGfcAfUfcgcgGfaGfgagccsgsc	494	GCGGCTCCTCCGCGATGC CGATG	629
csusccgcGfaUfGfCfGaugaccuuL96	360	asAfsccgCfaUfCfGgcaUfcGfcgagsgsa	495	TCCTCCGCGATGCCGATG ACCTG	630
gsasugccGfaUfGfAfcugcagaaL96	361	asUfsucuGfcAfGfgucaUfcGfgcaucsgsc	496	GCGATGCCGATGACCTGC AGAAG	631
gsasugacCfuGfCfAfgaagccuuL96	362	asAfsccgGfcUfUfcugcAfgGfcaucsgsg	497	CCGATGACCTGCAGAAGC GCCTG	632
csusgcagAfaGfCfGfccuggcaguL96	363	asAfsucgCfcAfGfgcgUfuCfugcagsgsu	498	ACCTGCAGAAGCGCCTGG CAGTG	633
asasgcgcCfuGfGfCfaguguaccuuL96	364	asUfsccgAfcAfCfugccAfgGfcgcuuscsu	499	AGAAGCGCCTGGCAGTGT ACCAG	634
csusggcaGfuGfUfAfcaggccguL96	365	asCfscggCfcUfGfguacAfcUfgccagsgsc	500	GCCTGGCAGTGTACCAGG CCGGG	635

gsasgcgcGfgCfCfUfcagcgccauL96	366	asAfsuggCfgCfUfgaggCfcGfcgcucsgsg	501	CCGAGCGCGGCCTCAGCG CCATC	636
csgsgccuCfaGfCfGfccauccgcguL96	367	asCfsgcgGfaUfGfgcgcUfgAfggccgscsg	502	CGCGGCCTCAGCGCCATC CGCGA	637
asgscgccAfuCfCfGfcgagcgccuuL96	368	asAfsggcGfcUfCfgcggAfuGfgcgcusgsa	503	TCAGCGCCATCCGCGAGC GCCTG	638
usgsgggcCfcCfUfGfguggaacaguL96	369	asCfsuguUfcCfAfccagGfgGfccccasgsg	504	CCTGGGGCCCCTGGTGGA ACAGG	639
cscscugGfuGfGfAfacagggccguL96	370	asCfsggcCfcUfGfuuccAfcCfaggggscsc	505	GGCCCCTGGTGGAACAG GGCCGC	640
csgscgugCfgGfGfCfcgccacuguuL96	371	asAfsagUfgGfCfggccCfcCfacgcgsgsc	506	GCCGCGTGCGGGCCGCCA CTGTG	641
gscscgccAfcUfGfUfgggcuccuuL96	372	asAfsgggAfgCfCfcacaGfuGfgcggcscsc	507	GGGCGCCACTGTGGGCT CCCTG	642
cscsuggcCfgGfCfCfagccgcuacuL96	373	asGfsuagCfgGfCfuggcCfgGfccaggsgsa	508	TCCCTGGCCGGCCAGCCG CTACA	643
gsgscagCfcGfCfUfacaggagcguL96	374	asCfsgcuCfcUfGfuagcGfgCfuggccsgsg	509	CCGGCCAGCCGCTACAGG AGCGG	644
gscscgcuAfcAfGfGfagcgggcccL96	375	asGfsggcCfcGfCfuccuGfuAfgcggcsusg	510	CAGCCGCTACAGGAGCG GGCCCA	645
gscsgcggAfuGfGfAfggagauggguL96	376	asCfsccaUfcUfCfcuccAfuCfcgcgscgsc	511	GCGCGCGGATGGAGGAG ATGGGC	646

csgscgacCfGfCfUfggacgagguL96	377	asAfscCuCfGfUfCfcaggCfGfucgcgsgsg	512	CCCGCGACCGCCTGGACG AGGTG	647
gscscuggAfcGfAfGfgugaaggaguL96	378	asCfsuccUfuCfAfcucGfuCfcaggcsgsg	513	CCGCCTGGACGAGGTGA AGGAGC	648
gsascgagGfuGfAfAfggagcagguL96	379	asAfscCuGfcUfCfcuucAfcCfucgucscsa	514	TGGACGAGGTGAAGGAG CAGGTG	649
gsgsagguGfcGfCfGfccaaagcugguL96	380	asCfscagCfuUfGfgcgcGfcAfcuccsgsc	515	GCGGAGGTGCGCGCCAA GCTGGA	650
csgscgccAfaGfCfUfggaggagcauL96	381	asUfsgcuCfcUfCfcagcUfuGfgcgcgscsa	516	TGCGCGCCAAGCTGGAG GAGCAG	651
csasggccCfaGfCfAfgauacccuuL96	382	asAfsggcGfuAfUfcugcUfgGfgccugscsu	517	AGCAGGCCCAGCAGATA CGCCTG	652
cscsagcaGfaUfAfCfGCCugcagguL96	383	asCfscugCfaGfGfcguaUfcUfgcuggsgsc	518	GCCCAGCAGATACGCCTG CAGGC	653
csgscugCfaGfGfCfcgaggccuuuL96	384	asAfsaggCfcUfCfggccUfgCfaggcgsusa	519	TACGCCTGCAGGCCGAGG CCTTC	654
gscsaggcCfGfAfGfGfccuuccagguL96	385	asCfscugGfaAfGfgccuCfGfGfcugcsasg	520	CTGCAGGCCGAGGCCTTC CAGGC	655
cscsgaggCfcUfUfCfcaggcccgcL96	386	asGfscggGfcCfUfggaaGfgCfcucggscsc	521	GGCCGAGGCCTTCCAGGC CCGCC	656
gscscuucCfaGfGfCfccgccucaaL96	387	asUfsugaGfgCfGfggccUfgGfaaggcscsu	522	AGGCCTTCCAGGCCCGCC TCAAG	657

cscsaggcCfcGfCfcucaagagcuuL96	388	asAfsgcuCfuUfGfaggcGfgGfccuggsasa	523	TTCCAGGCCCCGCCTCAAG AGCTG	658
cscsgccuCfaAfGfAfgcugguucguL96	389	asCfsgaaCfcAfGfcucuUfgAfggcggsgsc	524	GCCCGCCTCAAGAGCTGG TTCGA	659
csasagagCfuGfGfUfucgagcccuL96	390	asGfsgggCfuCfGfaaccAfgCfucuugsasg	525	CTCAAGAGCTGGTTCGAG CCCCT	660
asgscuccUfgGfUfGfgaagacauguL96	391	asCfsaugUfcUfUfccacCfaGfgggcuscsg	526	CGAGCCCCTGGTGGAAG ACATGC	661
csusggugGfaAfGfAfcaugcagcguL96	392	asCfsgcuGfcAfUfgucuUfcCfaccagsgsg	527	CCCTGGTGGAAGACATGC AGCGC	662
gsgsaagaCfaUfGfCfagcgcaguuL96	393	asAfscugGfcGfCfugcaUfgUfcuuccsasc	528	GTGGAAGACATGCAGCG CCAGTG	663
gscscgggCfuGfGfUfggagaagguuL96	394	asAfscuUfcUfCfcaccAfgCfccggcscsc	529	GGGCCGGGCTGGTGGAAG AAGGTG	664
gscsugguGfgAfGfAfaggugcagguL96	395	asCfscugCfaCfCfuucuCfcAfccagcscsc	530	GGGCTGGTGGAAGAAGGT GCAGGC	665
ascscagcGfcCfGfCfccugugccuL96	396	asGfsgcaCfaGfGfggcgGfcGfcuggusgsc	531	GCACCAGCGCCGCCCCTG TGCCC	666
gscscuccGfuGfCfCfcagcgacaauL96	397	asUfsuguCfgCfUfgggcAfcAfggggcsrgsg	532	CCGCCCCTGTGCCAGCG ACAAT	667
usgsugccCfaGfCfGfacaucacuuL96	398	asAfsgugAfuUfGfucgcUfgGfgcacasrgsg	533	CCTGTGCCAGCGACAAT CACTG	668

csasgcgaCfaAfUfCfacugaacgcuL96	399	asGfscguUfcAfGfugauUfgUfcgugsgsg	534	CCCAGCGACAATCACTGA ACGCC	669
csasaucaCfuGfAfAfcgccgaagcuL96	400	asGfscuuCfGfCfGuucAfgUfgauugsusc	535	GACAATCACTGAACGCCG AAGCC	670
ascsugaaCfGfCfGfaagccugcauL96	401	asUfsgcaGfGfUfucggCfGfucagusgsa	536	TCACTGAACGCCGAAGCC TGCAG	671
ascsgccgAfaGfCfCfugcagccauuL96	402	asAfsuggCfuGfCfagggUfuCfggcgususc	537	GAACGCCGAAGCCTGCA GCCATG	672
gsasagccUfGfAfGfccaugcgacuL96	403	asGfsucgCfaUfGfGfcugCfaGfgcuucsgsg	538	CCGAAGCCTGCAGCCATG CGACC	673
usgscagcCfaUfGfCfGacccacguL96	404	asCfsgugGfGfUfGfcaUfgGfcugcasgsg	539	CCTGCAGCCATGCGACCC CACGC	674
gscsgaccCfcAfCfGfccacccguuL96	405	asAfsaggGfGfUfGfGfcguGfGfGfcgcsasu	540	ATGCGACCCACGCCACC CCGTG	675
cscscagCfcAfCfCfccgugccucuL96	406	asGfsaggCfaCfGfGggguGfGfGfGggsgsu	541	ACCCACGCCACCCCGTG CCTCC	676
cscsacccCfGfUfGfCfcuccugccuuL96	407	asAfsaggAfgGfAfggcaCfGfGgugsgsg	542	CGCCACCCCGTGCTCCT GCCTC	677
csgsugccUfcCfUfGfCfcuccgcgcuL96	408	asGfscgcGfGfAfGfGfcagGfaGfGfcacsgsg	543	CCCGTGCTCCTGCCTCC GCGCA	678
csusccugCfcUfCfCfGcgagccuuL96	409	asAfsaggUfgCfGfGggaGfGfGfGagsgsc	544	GCCTCCTGCCTCCGCGCA GCCTG	679

gscscuccGfcGfCfAfgccugcagcuL96	410	asGfscugCfaGfGfcugcGfcGfgaggcsasg	545	CTGCCTCCGCGCAGCCTG CAGCG	680
cscsugucCfcCfGfCfcccagccguuL96	411	asAfsaggCfuGfGfggcgGfgGfacaggsgsu	546	ACCCTGTCCCCGCCCCAG CCGTC	681
cscscgccCfcAfGfCfcguccuccuuL96	412	asAfsaggGfgAfCfggcuGfgGfgcggsgsa	547	TCCCCGCCCCAGCCGTCC TCCTG	682
cscscagcCfgUfCfCfuccuggggguuL96	413	asAfscccCfaGfGfaggaCfgGfcuggsgsc	548	GCCCCAGCCGTCCTCCTG GGGTG	683
uscscuggGfgUfGfGfaccuaguuuL96	414	asAfsacuAfgGfGfuccaCfcCfcaggasgsg	549	CCTCCTGGGGTGGACCCT AGTTT	684
gsgsguggAfcCfCfUfaguuaauauL96	415	asUfsauuAfaAfCfuaggGfuCfcaccscsa	550	TGGGGTGGACCCTAGTTT AATAA	685
gsascccuAfgUfUfUfaauaaagauuL96	416	asAfsucuUfuAfUfuaaaCfuAfgggucscsa	551	TGGACCCTAGTTTAATAA AGATT	686
usasguuuAfaUfAfAfagauucaccuL96	417	asGfsgugAfaUfCfuuuuUfuAfaacuasgsg	552	CCTAGTTTAATAAAGATT CACCA	687
usasauaaAfgAfUfUfcaccaaguuuL96	418	asAfsacuUfgGfUfgaaucfuUfuauuasasa	553	TTTAATAAAGATTCACCA AGTTT	688
asgsauucAfcCfAfAfguuucacgcuL96	419	asGfscguGfaAfAfcuugGfuGfaaucususu	554	AAAGATTCACCAAGTTTC ACGCA	689

Таблица 4. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи АРОЕ

ID дуплекса	Последовательность смысловой цепи от 5' до 3'	SEQ ID NO:	Последовательность антисмысловой цепи от 5' до 3'	SEQ ID NO:
-------------	--	------------	--	------------

AD-1072375.1	GGAGUUGAAGGCCUACAAAU	49	AAUUUGUAGGCCUUAACUCCU	184
AD-1072352.1	GCGCUGAUGGACGAGACCAU	46	AAUGGUCUCGUCCAUCAGCGCC	181
AD-1072394.1	UCGGAACUGGAGGAACAACU	52	AAGUUGUUCCUCCAGUUCCGAU	187
AD-1072721.1	ACGCCGAAGCCUGCAGCCAU	132	AAUGGCUGCAGGCUUCGGCGUUC	267
AD-1072254.1	CACUGGGUCGCUUUUGGGAU	35	AAUCCCAAAGCGACCCAGUGCC	170
AD-1072189.1	AAGGUGGAGCAAGCGGUGGAU	26	AUCCACCGCUUGCUCACCUCUGG	161
AD-1072741.1	GACCCUAGUUUAAUAAAGAU	146	AAUCUUUAUUAACUAGGGUCCA	281
AD-1072382.1	AAGGCCUACAAAUUCGGAACU	50	AAGUUCCGAUUUGUAGGCCUUA	185
AD-1072129.1	AGGAAGAUGAAGGUUCUGUGU	17	ACACAGAACCUUCAUCUCCUGC	152
AD-1072514.1	CUCCGCGAUGCCGAUGACCU	90	AAGGUCAUCGGCAUCGCGGAGGA	225
AD-1072124.1	CAGGCAGGAAGAUGAAGGUUU	16	AAACCUUCAUCUCCUGCCUGUG	151
AD-1072337.1	ACCCAGGAACUGAGGGCGCU	44	AAGCGCCCUCAGUCCUGGGUGA	179
AD-1072135.1	AUGAAGGUUCUGUGGGCUGCU	18	AGCAGCCCACAGAACCUUCAUCU	153
AD-1072745.1	UAGUUUAAUAAAGAUUCACCU	147	AGGUGAAUCUUUAUUAACUAGG	282
AD-1072153.1	GCGUUGCUGGUCACAUUCCU	21	AAGGAAUGUGACCAGCAACGCAG	156
AD-1072520.1	GAUGCCGAUGACCUGCAGAAU	91	AUUCUGCAGGUCAUCGGCAUCGC	226
AD-1072389.1	ACAAAUUCGGAACUGGAGGAAU	51	AUCCUCCAGUUCCGAUUUGUAG	186
AD-1072716.1	ACUGAACGCCGAAGCCUGCAU	131	AUGCAGGCUUCGGCGUUCAGUGA	266
AD-1072222.1	CCAGCAGACCGAGUGGCAGAU	31	AUCUGCCACUCGGUCUGCUGGCG	166
AD-1072367.1	ACCAUGAAGGAGUUGAAGGCU	48	AGCCUUAACUCCUUCAUGGUCU	183
AD-1103894.1	AGAUUCACCAAGUUUCACGCU	149	AGCGUGAAACUUGGUGAAUCUUU	284
AD-1072651.1	GCCUUCCAGGCCCGCCUCAAU	117	AUUGAGGCGGGCCUGGAAGGCCU	252

AD-1072260.1	GUCGCUUUUGGGAUUACCUGU	36	ACAGGUA AUCCCAAAGCGACCC	171
AD-1072265.1	UUUUGGGAUUACCUGCGCUGU	37	ACAGCGCAGGUAAUCCCAAAGC	172
AD-1072750.1	UAAUAAAGAUUCACCAAGUUU	148	AAACUUGGUGAAUCUUUAUUA	283
AD-1072142.1	UUCUGUGGGCUGCGUUGCUGU	19	ACAGCAACGCAGCCCACAGAACC	154
AD-1072328.1	UCCAGGUCACCCAGGAACUU	43	AAGUUCUGGGUGACCUGGGAGC	178
AD-1072198.1	CAAGCGGUGGAGACAGAGCCU	27	AGGCUCUGUCUCCACCGCUUGC	162
AD-1072361.1	GACGAGACCAUGAAGGAGUUU	47	AAACUCCUUCAUGGUCUCGUCCA	182
AD-1072526.1	GAUGACCUGCAGAAGCGCCUU	92	AAGGCGCUUCUGCAGGUCAUCGG	227
AD-1072699.1	UGUGCCCAGCGACAAUCACUU	128	AAGUGAUUGUCGCUGGGCACAGG	263
AD-1072711.1	CAAUCACUGAACGCCGAAGCU	130	AGCUUCGGCGUUCAGUGAUUGUC	265
AD-1103879.1	CAAGAGCUGGUUCGAGCCCCU	120	AGGGGCUCGAACCAGCUCUUGAG	255
AD-1103849.1	GAGGAACAACUGACCCCGGUU	53	AACCGGGGUCAGUUGUCCUCCA	188
AD-1072662.1	CCGCCUCAAGAGCUGGUUCGU	119	ACGAACCAGCUCUUGAGGCGGGC	254
AD-1103883.1	UGCAGCCAUGCGACCCACGU	134	ACGUGGGGUCGCAUGGCUGCAGG	269
AD-1072172.1	UGGCAGGAUGCCAGGCCAAGU	24	ACUUGGCCUGGCAUCCUGCCAGG	159
AD-1072158.1	GCUGGUCACAUUCCUGGCAGU	22	ACUGCCAGGAAUGUGACCAGCAA	157
AD-1072705.1	CAGCGACAAUCACUGAACGCU	129	AGCGUUCAGUGAUUGUCGCUGGG	264
AD-1072147.1	UGGGCUGCGUUGCUGGUCACU	20	AGUGACCAGCAACGCAGCCCACA	155
AD-1072593.1	GACGAGGUGAAGGAGCAGGUU	109	AACCUGCUCCUUCACCUCGUCCA	244
AD-1072115.1	GGCCAAUCACAGGCAGGAAGU	15	ACUUCCUGCCUGUGAUUGGCCAG	150
AD-1072289.1	CAGACACUGUCUGAGCAGGUU	40	AACCUGCUCAGACAGUGUCUGCA	175
AD-1072283.1	UGGGUGCAGACACUGUCUGAU	39	AUCAGACAGUGUCUGCACCCAGC	174

AD-1103871.1	CGGCCUCAGCGCCAUCCGCGU	97	ACGCGGAUGGCGCUGAGGCCGCG	232
AD-1072183.1	CAGGCCAAGGUGGAGCAAGCU	25	AGCUUGCUCACCUCUGGCCUGGC	160
AD-1072667.1	CUGGUGGAAGACAUGCAGCGU	122	ACGCUGCAUGUCUCCACCAGGG	257
AD-1072614.1	CGCGCCAAGCUGGAGGAGCAU	111	AUGCUCUCCAGCUUGGCGCGCA	246
AD-1072632.1	CAGGCCCAGCAGAUACGCCUU	112	AAGGCGUAUCUGCUGGGCCUGCU	247
AD-1072211.1	CCCGAGCUGCGCCAGCAGACU	29	AGUCUGCUGGCGCAGCUCGGGCU	164
AD-1072406.1	GCACGGCUGUCCAAGGAGCUU	55	AAGCUCCUUGGACAGCCGUGCCC	190
AD-1103882.1	GCCCCUGUGCCCAGCGACAAU	127	AUUGUCGCUGGGCACAGGGGCGG	262
AD-1103855.1	GACAUGGAGGACGUGCGCGGU	64	ACCGCGCACGUCCUCCAUGUCCG	199
AD-1072726.1	GAAGCCUGCAGCCAUGCAGACU	133	AGUCGCAUGGCUGCAGGCUUCGG	268
AD-1103893.1	UCCUGGGGUGGACCCUAGUUU	144	AAACUAGGGUCCACCCCAGGAGG	279
AD-1072736.1	GGGUGGACCCUAGUUUAAUAU	145	AUAUUAACUAGGGUCCACCCCA	280
AD-1072426.1	GCGGACAUGGAGGACGUGUGU	60	ACACACGUCCUCCAUGUCCGCGC	195
AD-1072506.1	GUAAGCGGCUCCUCCGCGAUU	88	AAUCGCGGAGGAGCCGCUUACGC	223
AD-1072248.1	AACUGGCACUGGGUCGCUUUU	34	AAAAGCGACCCAGUGCCAGUUCC	169
AD-1072203.1	GGUGGAGACAGAGCCGGAGCU	28	AGCUCCGGCUCUGUCUCCACCGC	163
AD-1103888.1	CUCCUGCCUCCGCGCAGCCUU	139	AAGGCUGCGCGGAGGCAGGAGGC	274
AD-1072243.1	CUGGGAACUGGCACUGGGUCU	33	AGACCCAGUGCCAGUUCCCAGCG	168
AD-1103886.1	CCACCCCGUGCCUCCUGCCUU	137	AAGGCAGGAGGCACGGGGUGGCG	272
AD-1072347.1	UGAGGGCGCUGAUGGACGAGU	45	ACUCGUCCAUCAGCGCCCUCAGU	180
AD-1072411.1	GCUGUCCAAGGAGCUGCAGGU	56	ACCUGCAGCUCCUUGGACAGCCG	191
AD-1072319.1	CUGCUCAGCUCCAGGUCACU	42	AGUGACCUGGGAGCUGAGCAGCU	177

AD-1103885.1	CCCACGCCACCCCGUGCCUCU	136	AGAGGCACGGGGUGGCGUGGGGU	271
AD-1072488.1	CCCACCUGCGCAAGCUGCGUU	85	AACGCAGCUUGCGCAGGUGGGAG	220
AD-1072532.1	CUGCAGAAGCGCCUGGCAGUU	93	AACUGCCAGGCGCUUCUGCAGGU	228
AD-1072493.1	CUGCGCAAGCUGCGUAAGCGU	86	ACGCUUACGCAGCUUGCGCAGGU	221
AD-1072686.1	GCUGGUGGAGAAGGUGCAGGU	125	ACCUGCACCUUCUCCACCAGCCC	260
AD-1072656.1	CCAGGCCCCGCCUCAAGAGCUU	118	AAGCUCUUGAGGCGGGCCUGGAA	253
AD-1103851.1	CGCGGACAUGGAGGACGUGCU	59	AGCACGUCCUCCAUGUCCGCGCC	194
AD-1072216.1	GCUGCGCCAGCAGACCGAGUU	30	AACUCGGUCUGCUGGCGCAGCUC	165
AD-1072455.1	GAGGUGCAGGCCAUGCUCGGU	79	ACCGAGCAUGGCCUGCACCUCGC	214
AD-1072581.1	CGCGACCGCCUGGACGAGGUU	107	AACCUCGUCCAGGCGGUCGCGGG	242
AD-1072499.1	AAGCUGCGUAAGCGGCUCCUU	87	AAGGAGCCGCUUACGCAGCUUGC	222
AD-1103854.1	GGACAUGGAGGACGUGCGCGU	63	ACGCGCACGUCCUCCAUGUCCGC	198
AD-1072672.1	GGAAGACAUGCAGCGCCAGUU	123	AACUGGCGCUGCAUGUCUCCAC	258
AD-1072644.1	CGCCUGCAGGCCGAGGCCUUU	114	AAAGGCCUCGGCCUGCAGGCGUA	249
AD-1103850.1	GCCCGGCUGGGCGCGGACAUU	57	AAUGUCCGCGCCCAGCCGGGCCU	192
AD-1103875.1	CGCGUGCGGGCCGCCACUGUU	101	AACAGUGGCGGCCCCGCACGCGGC	236
AD-1072401.1	CGCGGGCACGGCUGUCCAAGU	54	ACUUGGACAGCCGUGCCCGCGUC	189
AD-1072438.1	CGCCUGGUGCAGUACCGCGGU	78	ACCGCGGUACUGCACCAGGCGGC	213
AD-1072310.1	CAGGAGGAGCUGCUCAGCUCU	41	AGAGCUGAGCAGCUCCUCCUGCA	176
AD-1072277.1	CUGCGCUGGGUGCAGACACUU	38	AAGUGUCUGCACCCAGCGCAGGU	173
AD-1103852.1	GCGGACAUGGAGGACGUGCGU	61	ACGCACGUCCUCCAUGUCCGCGC	196
AD-1072483.1	CGCCUCCCACCUGCGCAAGCU	84	AGCUUGCGCAGGUGGGAGGCGAG	219

AD-1072569.1	GCGCGGAUGGAGGAGAUGGGU	106	ACCCAUCUCCUCCAUCCGCGCGC	241
AD-1072473.1	GGCCAGAGCACCGAGGAGCUU	81	AAGCUCCUCGGUGCUCUGGCCGA	216
AD-1103868.1	GCUGCGGGUGCGCCUCGCCUU	82	AAGGCGAGGCGCACCCGCAGCUC	217
AD-1103858.1	AUGGAGGACGUGCGCGGCCGU	67	ACGGCCGCGCACGUCCUCCAUGU	202
AD-1103857.1	CAUGGAGGACGUGCGCGGCCU	66	AGGCCGCGCACGUCCUCCAUGUC	201
AD-1103861.1	GAGGACGUGCGCGGCCGCCUU	70	AAGGCGGCCGCGCACGUCCUCCA	205
AD-1103891.1	CCCGCCCCAGCCGUCCUCCUU	142	AAGGAGGACGGCUGGGGCGGGGA	277
AD-1103870.1	GAGCGCGGCCUCAGCGCCAUI	96	AAUGGCGCUGAGGCCGCGCUCGG	231
AD-1103867.1	GUGCGCGGCCGCCUGGUGCAU	76	AUGCACCAGGCGGCCGCGCACGU	211
AD-1072433.1	GCGGCCGCCUGGUGCAGUACU	77	AGUACUGCACCAGGCGGCCGCAC	212
AD-1103872.1	AGCGCCAUCCGCGAGCGCCUU	98	AAGGCGCUCGCGGAUGGCGCUGA	233
AD-1103889.1	GCCUCCGCGCAGCCUGCAGCU	140	AGCUGCAGGCUGC GCGGAGGCAG	275
AD-1103864.1	GACGUGCGCGGCCGCCUGGUU	73	AACCAGGCGGCCGCGCACGUCCU	208
AD-1072464.1	GCCAUGCUCGGCCAGAGCACU	80	AGUGCUCUGGCCGAGCAUGGCCU	215
AD-1103862.1	AGGACGUGCGCGGCCGCCUGU	71	ACAGGCGGCCGCGCACGUCCUCC	206
AD-1072637.1	CCAGCAGAUACGCCUGCAGGU	113	ACCUGCAGGCGUAUCUGCUGGGC	248
AD-1072420.1	CUGGGCGCGGACAUGGAGGAU	58	AUCCUCCAUGUCCGCGCCCAGCC	193
AD-1072238.1	CAGCGCUGGGAACUGGCACUU	32	AAGUGCCAGUUCCCAGCGCUGGC	167
AD-1103866.1	CGUGCGCGGCCGCCUGGUGCU	75	AGCACCAGGCGGCCGCGCACGUC	210
AD-1103873.1	UGGGGCCCCUGGUGGAACAGU	99	ACUGUUCCACCAGGGGCCCCAGG	234
AD-1103869.1	GUGCGCCUCGCCUCCCACCUU	83	AAGGUGGGAGGCGAGGCGCACCC	218
AD-1072588.1	GCCUGGACGAGGUGAAGGAGU	108	ACUCCUUCACCUCGUCCAGGCGG	243

AD-1072544.1	CUGGCAGUGUACCAGGCCGGU	95	ACCGGCCUGGUACACUGCCAGGC	230
AD-1103859.1	UGGAGGACGUGCGCGGCCGCU	68	AGCGGCCGCGCACGUCCUCCAUG	203
AD-1103853.1	CGGACAUGGAGGACGUGCGCU	62	AGCGCACGUCCUCCAUGUCCGCG	197
AD-1103856.1	ACAUGGAGGACGUGCGCGGCU	65	AGCCGCGCACGUCCUCCAUGUCC	200
AD-1072607.1	GGAGGUGCGCGCCAAGCUGGU	110	ACCAGCUUGGCGCGCACCUCGCG	245
AD-1103860.1	GGAGGACGUGCGCGGCCGCCU	69	AGGCGGCCGCGCACGUCCUCCAU	204
AD-1103884.1	GCGACCCACGCCACCCCGUU	135	AACGGGGUGGCGUGGGGUCGCAU	270
AD-1072551.1	GCCGCCACUGUGGGCUCCCUU	102	AAGGGAGCCCACAGUGGCGGCCC	237
AD-1103874.1	CCCCUGGUGGAACAGGGCCGU	100	ACGGCCCUGUUCCACCAGGGGCC	235
AD-1103890.1	CCUGUCCCCGCCCCAGCCGUU	141	AACGGCUGGGGCGGGGACAGGGU	276
AD-1103881.1	ACCAGCGCCGCCCCUGUGCCU	126	AGGCACAGGGGCGGCGCUGGUGC	261
AD-1103887.1	CGUGCCUCCUGCCUCCGCGCU	138	AGCGCGGAGGCAGGAGGCACGGG	273
AD-1103863.1	GGACGUGCGCGGCCGCCUGGU	72	ACCAGGCGGCCGCGCACGUCCUC	207
AD-1072509.1	GGCUCCUCCGCGAUGCCGAUU	89	AAUCGGCAUCGCGGAGGAGCCGC	224
AD-1103892.1	CCCAGCCGUCCUCCUGGGGUU	143	AACCCCAGGAGGACGGCUGGGGC	278
AD-1103877.1	GCCGCUACAGGAGCGGGCCCU	105	AGGGCCCGCUCCUGUAGCGGCUG	240
AD-1103865.1	ACGUGCGCGGCCGCCUGGUGU	74	ACACCAGGCGGCCGCGCACGUCC	209
AD-1072649.1	GCAGGCCGAGGCCUUCCAGGU	115	ACCUGGAAGGCCUCGGCCUGCAG	250
AD-1103880.1	AGCCCCUGGUGGAAGACAUGU	121	ACAUGUCUUCCACCAGGGGCUCG	256
AD-1103878.1	CCGAGGCCUUCCAGGCCCCGCU	116	AGCGGGCCUGGAAGGCCUCGGCC	251
AD-1072163.1	UCACAUUCCUGGCAGGAUGCU	23	AGCAUCCUGCCAGGAAUGUGACC	158
AD-1072681.1	GCCGGGCUGGUGGAGAAGGUU	124	AACCUUCUCCACCAGCCCGGCC	259

AD-1072559.1	GGCCAGCCGCUACAGGAGCGU	104	ACGCUCCUGUAGCGGCUGGCCGG	239
AD-1072538.1	AAGCGCCUGGCAGUGUACCAU	94	AUGGUACACUGCCAGGCGCUUCU	229
AD-1103876.1	CCUGGCCGGCCAGCCGCUACU	103	AGUAGCGGCUGGCCGGCCAGGGA	238

Таблица 5. Модифицированные дуплексные последовательности APOE

ID дуплекса	Последовательность смысловой цепи от 5' до 3'	SEQ ID NO:	Последовательность антисмысловой цепи от 5' до 3'	SEQ ID NO:
AD-1072375.1	gsgsaguuGfaAfGfGfccuacaaaau(L96)	319	asAfsuuuGfuAfGfgccuUfcAfacuccsusu	454
AD-1072352.1	gscsgcugAfuGfGfAfcgagaccauu(L96)	316	asAfsuggUfcUfCfguccAfuCfagcgcsesc	451
AD-1072394.1	uscsggaaCfuGfGfAfggaacaacuu(L96)	322	asAfsguuGfuUfCfcuccAfgUfuccgasusu	457
AD-1072721.1	ascsgccgAfaGfCfCfugcagccauu(L96)	402	asAfsuggCfuGfCfaggcUfuCfggcgususc	537
AD-1072254.1	csascuggGfuCfGfCfuuuugggauu(L96)	305	asAfsuccCfaAfAfagcgAfcCfcagugscsc	440
AD-1072189.1	asasggugGfaGfCfAfagcgguggau(L96)	296	asUfscCaCfcGfCfuugcUfcCfaccuusgsg	431
AD-1072741.1	gsascccuAfgUfUfUfaauaaagauu(L96)	416	asAfsucuUfuAfUfuaaaCfuAfgggucscsa	551
AD-1072382.1	asasggccUfaCfAfAfaucggaacuu(L96)	320	asAfsguuCfcGfAfuuugUfaGfgccuuscsa	455
AD-1072129.1	asgsgaagAfuGfAfAfgguucugugu(L96)	287	asCfsacaGfaAfCfcuucAfuCfuuccusgsc	422
AD-1072514.1	csusccgcGfaUfGfCfcgaugaccuu(L96)	360	asAfsrgguCfaUfCfggcaUfcGfcggagsgsa	495
AD-1072124.1	csasggcaGfgAfAfGfaugaagguuu(L96)	286	asAfsaccUfuCfAfucuuCfcUfgccugsusg	421
AD-1072337.1	ascscagGfaAfCfUfgagggcgcuu(L96)	314	asAfsrgcGfcCfUfcaguUfcCfugggusgsa	449
AD-1072135.1	asusgaagGfuUfCfUfgugggcugcu(L96)	288	asGfscagCfcCfAfcagaAfcCfuucauscsu	423
AD-1072745.1	usasguuuAfaUfAfAfagauucaccu(L96)	417	asGfsgugAfaUfCfuuuuUfuAfaacuasgsg	552
AD-1072153.1	gscsguugCfuGfGfUfcacauuccuu(L96)	291	asAfsrggaAfuGfUfgaccAfgCfaacgcsasg	426

AD-1072520.1	gsasugccGfaUfGfAfcugcagaau(L96)	361	asUfsucuGfcAfGfgucaUfcGfgcaucsgsc	496
AD-1072389.1	ascsaaauCfGfAfAfcuggaggaau(L96)	321	asUfsuccUfcCfAfguucCfGfAfuugusasg	456
AD-1072716.1	ascsugaaCfGfCfGfaagccugcau(L96)	401	asUfsgcaGfgCfUfucggCfGfUfucagusgsa	536
AD-1072222.1	cscsagcaGfaCfCfGfaguggcagau(L96)	301	asUfscugCfcAfCfucggUfcUfgcuggscsg	436
AD-1072367.1	ascscaugAfaGfGfAfguugaaggcu(L96)	318	asGfscuUfcAfAfcuccUfuCfaugguscsu	453
AD-1103894.1	asgsauucAfcCfAfAfguuucacgcu(L96)	419	asGfscguGfaAfAfcuugGfuGfaaucususu	554
AD-1072651.1	gscscuucCfaGfGfCfccgccucaau(L96)	387	asUfsugaGfgCfGfggccUfgGfaaggscsu	522
AD-1072260.1	gsuscgcuUfuUfGfGfgauuaccugu(L96)	306	asCfsaggUfaAfUfcccaAfaAfgcgacscsc	441
AD-1072265.1	ususuuggGfaUfUfAfcugcgcugu(L96)	307	asCfsagcGfcAfGfguaaUfcCfcaaaasgsc	442
AD-1072750.1	usasauaaAfgAfUfUfcaccaaguuu(L96)	418	asAfsacuUfgGfUfgaauCfuUfuauuasasa	553
AD-1072142.1	ususcuguGfgGfCfUfGcguugcugu(L96)	289	asCfsagcAfaCfGfcagcCfcAfcagaascsc	424
AD-1072328.1	uscscagGfuCfAfCfccaggaacuu(L96)	313	asAfsuguCfcUfGfggugAfcCfugggasgsc	448
AD-1072198.1	csasagcgGfuGfGfAfgacagagccu(L96)	297	asGfsgcuCfuGfUfcuccAfcCfGcuugscsu	432
AD-1072361.1	gsascgagAfcCfAfUfgaaggaguuu(L96)	317	asAfsacuCfcUfUfcaugGfuCfucguccsa	452
AD-1072526.1	gsasugacCfuGfCfAfgaagcgccuu(L96)	362	asAfsaggGfcUfUfcugcAfgGfcaucsgsg	497
AD-1072699.1	usgsugccCfaGfCfGfacaucacuu(L96)	398	asAfsugGfuUfGfucgcUfgGfgcacasgsg	533
AD-1072711.1	csasaucaCfuGfAfAfcgccgaagcu(L96)	400	asGfscuuCfGfCfGuucAfgUfgauugsusc	535
AD-1103879.1	csasagagCfuGfGfUfucgagcccu(L96)	390	asGfsgggCfuCfGfaaccAfgCfucuugsasg	525
AD-1103849.1	gsasggaaCfaAfCfUfgaccccgguu(L96)	323	asAfsccgGfgGfUfcaguUfgUfuccucscsa	458
AD-1072662.1	cscsgccuCfaAfGfAfgcugguucgu(L96)	389	asCfsgaaCfcAfGfcucuUfgAfggcgsgsg	524
AD-1103883.1	usgscagcCfaUfGfCfGacccacgu(L96)	404	asCfsgugGfgGfUfcgcaUfgGfcugcasgsg	539
AD-1072172.1	usgsgcagGfaUfGfCfcaggccaagu(L96)	294	asCfsuugGfcCfUfggcaUfcCfugccasgsg	429

AD-1072158.1	gscsugguCfaCfAfUfuccuggcagu(L96)	292	asCfsugcCfaGfGfaaugUfgAfccagcsasa	427
AD-1072705.1	csasgcgaCfaAfUfCfacugaacgcu(L96)	399	asGfscguUfcAfGfugauUfgUfcgugsgsg	534
AD-1072147.1	usgsggcuGfcGfUfUfgcuggucacu(L96)	290	asGfsugaCfcAfGfcaacGfcAfgcccasca	425
AD-1072593.1	gsascgagGfuGfAfAfggagcagguu(L96)	379	asAfscuGfcUfCfcuucAfcCfucgucscsa	514
AD-1072115.1	gsgsccaaUfcAfCfAfggcaggaagu(L96)	285	asCfsuucCfuGfCfcuguGfaUfuggccsasg	420
AD-1072289.1	csasgacaCfuGfUfCfugagcagguu(L96)	310	asAfscuGfcUfCfagacAfgUfgucugscsa	445
AD-1072283.1	usgsggugCfaGfAfCfacugucugau(L96)	309	asUfscagAfcAfGfugucUfgCfaccasgsc	444
AD-1103871.1	csgsgccuCfaGfCfGfccauccgcu(L96)	367	asCfsgcgGfaUfGfgcgcUfgAfggccgscsg	502
AD-1072183.1	csasggccAfaGfGfUfggagcaagcu(L96)	295	asGfscuuGfcUfCfcaccUfuGfgccugsgsc	430
AD-1072667.1	csusggugGfaAfGfAfaugcagcgu(L96)	392	asCfsgcuGfcAfUfgucuUfcCfaccagsgsg	527
AD-1072614.1	csgscgccAfaGfCfUfggaggagcau(L96)	381	asUfsgcuCfcUfCfcagcUfuGfgcgcgscsa	516
AD-1072632.1	csasggccCfaGfCfAfgauacgccuu(L96)	382	asAfsggcGfuAfUfcugcUfgGfgccugscsu	517
AD-1072211.1	cscscgagCfuGfCfGfccagcagacu(L96)	299	asGfsucuGfcUfGfgcgcAfgCfucgggscsu	434
AD-1072406.1	gscsacggCfuGfUfCfcaaggagcuu(L96)	325	asAfsgcuCfcUfUfggacAfgCfcgugcscsc	460
AD-1103882.1	gscscccuGfuGfCfCfcagcgacaau(L96)	397	asUfsuguCfgCfUfgggcAfcAfggggcsgsg	532
AD-1103855.1	gsascaugGfaGfGfAfcgugcgcggu(L96)	334	asCfscgcGfcAfCfguccUfcCfaugucscsg	469
AD-1072726.1	gsasagccUfgCfAfGfccaugcgacu(L96)	403	asGfsucgCfaUfGfgcugCfaGfgcuucsgsg	538
AD-1103893.1	uscscuggGfgUfGfGfaccuaguuu(L96)	414	asAfsacuAfgGfGfuccaCfcCfcaggasgsg	549
AD-1072736.1	gsgsguggAfcCfCfUfaguuuauau(L96)	415	asUfsauuAfaAfCfuaggGfuCfaccscsa	550
AD-1072426.1	gscsggacAfuGfGfAfggacgugugu(L96)	330	asCfsacaCfgUfCfcuccAfuGfuccgscgsc	465
AD-1072506.1	gsusaagcGfgCfUfCfcuccgcgauu(L96)	358	asAfsucgCfgGfAfggagCfcGfcuuacsgsc	493
AD-1072248.1	asascuggCfaCfUfGfggucgcuuuu(L96)	304	asAfsaagCfgAfCfccagUfgCfcaguuscsc	439

AD-1072203.1	gsgsuggaGfaCfAfGfagccggagcu(L96)	298	asGfscucCfgGfCfucugUfcUfccaccsgsc	433
AD-1103888.1	csusccugCfcUfCfCfGcgagccuu(L96)	409	asAfsggcUfgCfGfcggaGfgCfaggagsgsc	544
AD-1072243.1	csusgggaAfcUfGfGfcacugggucu(L96)	303	asGfsaccCfaGfUfgccaGfuUfccagsgscg	438
AD-1103886.1	cscsacceCfgUfGfCfcuccugccuu(L96)	407	asAfsggcAfgGfAfggcaCfgGfgguggsgscg	542
AD-1072347.1	usgsagggCfgCfUfGfauggacgagu(L96)	315	asCfsucgUfcCfAfucagCfgCfccucasgsu	450
AD-1072411.1	gscsugucCfaAfGfGfagcugcaggu(L96)	326	asCfscugCfaGfCfuccuUfgGfacagsgscg	461
AD-1072319.1	csusgcucAfgCfUfCfccaggucacu(L96)	312	asGfsugaCfcUfGfggagCfuGfagcagscsu	447
AD-1103885.1	cscscacgCfcAfCfCfccgugccucu(L96)	406	asGfsaggCfaCfGfggggUfgCfugggsgsu	541
AD-1072488.1	cscscaccUfgCfGfCfaagcugcguu(L96)	355	asAfsccgAfgCfUfugcgCfaGfgugggsasg	490
AD-1072532.1	csusgcagAfaGfCfGfccuggcaguu(L96)	363	asAfsucgCfcAfGfgcgcUfuCfugcagsgsu	498
AD-1072493.1	csusgcgcAfaGfCfUfgcguaagcgu(L96)	356	asCfsgcuUfaCfGfcagcUfuGfGcgagsgsu	491
AD-1072686.1	gscsugguGfgAfGfAfaggugcaggu(L96)	395	asCfscugCfaCfCfuucuCfcAfccagsgsc	530
AD-1072656.1	cscsaggeCfcGfCfCfucaagagcuu(L96)	388	asAfsgeuCfuUfGfaggeGfgGfccuggsasa	523
AD-1103851.1	csgscggaCfaUfGfGfaggacgugcu(L96)	329	asGfscacGfuCfCfuccaUfgUfccgsgsc	464
AD-1072216.1	gscsugcgCfcAfGfCfagaccgaguu(L96)	300	asAfsucGfgUfCfugcuGfgCfGcagsusc	435
AD-1072455.1	gsasggugCfaGfGfCfcaugcucggu(L96)	349	asCfscgaGfcAfUfggccUfgCfaccucsgsc	484
AD-1072581.1	csgscgacCfgCfCfUfggacgagguu(L96)	377	asAfsccuCfgUfCfcaggCfgGfucgsgsgsg	512
AD-1072499.1	asasgcugCfgUfAfAfgcggcuccuu(L96)	357	asAfsngaGfcCfGfcuuaCfgCfagcuusgsc	492
AD-1103854.1	gsgsacauGfgAfGfGfacugcgcggu(L96)	333	asCfsgcgCfaCfGfuccuCfcAfuguccsgsc	468
AD-1072672.1	gsgsaagaCfaUfGfCfagcgccaguu(L96)	393	asAfsucgGfcGfCfugcaUfgUfcuuccsasc	528
AD-1072644.1	csgsccugCfaGfGfCfcgaggccuuu(L96)	384	asAfsaggCfcUfCfggccUfgCfaggcgssusa	519
AD-1103850.1	gscsccggCfuGfGfGfcgcgacauu(L96)	327	asAfsuguCfcGfCfGcccAfgCfcgggscsu	462

AD-1103875.1	csgscgugCfgGfGfCfcgccacuguu(L96)	371	asAfscagUfgGfCfggccCfGcfacgcgsgsc	506
AD-1072401.1	csgscgggCfaCfGfGfcuguccaagu(L96)	324	asCfsuugGfaCfAfgccgUfgCfccgcgsusc	459
AD-1072438.1	csgsccugGfuGfCfAfguaccgcggu(L96)	348	asCfscgcGfgUfAfcugcAfcCfaggcgsgsc	483
AD-1072310.1	csasggagGfaGfCfUfgcucagcucu(L96)	311	asGfsagcUfgAfGfcagcUfcCfuccugscsa	446
AD-1072277.1	csusgcgcUfgGfGfUfgcagacacuu(L96)	308	asAfsugUfcUfGfcaccCfaGfcgcagsgsu	443
AD-1103852.1	gscsggacAfuGfGfAfggacgugcg(L96)	331	asCfsgcaCfGfCfcuccAfuGfuccgcsgsc	466
AD-1072483.1	csgsccucCfcAfCfCfugcgcaagcu(L96)	354	asGfscuuGfcGfCfagguGfgGfaggcgsgsg	489
AD-1072569.1	gscsgcggAfuGfGfAfggagauuggu(L96)	376	asCfscgaUfcUfCfcuccAfuCfcgcgcsgsc	511
AD-1072473.1	gsgsccagAfgCfAfCfagaggagcu(L96)	351	asAfsagcuCfcUfCfaggugCfuCfuggccsgsa	486
AD-1103868.1	gscsugcgGfgUfGfCfGCCucgcuu(L96)	352	asAfsaggGfaGfGfcgaCfcCfagcgsusc	487
AD-1103858.1	asusggagGfaCfGfUfgcgcgccgu(L96)	337	asCfsggcCfGfGfcacgUfcCfuccausgsu	472
AD-1103857.1	csasuggaGfgAfCfGfugcgcgccu(L96)	336	asGfsgccGfcGfCfagcuCfcUfccaugsusc	471
AD-1103861.1	gsasggacGfuGfCfGfcggccgcuu(L96)	340	asAfsaggGfgCfCfagcgcAfcGfuccucscsa	475
AD-1103891.1	cscscgccCfcAfGfCfcguccuccuu(L96)	412	asAfsaggGfgAfCfaggcuGfgGfgcggsgsa	547
AD-1103870.1	gsasgcgcGfgCfCfUfcagcgccauu(L96)	366	asAfsuggCfGfUfgaggCfcGfcgcucsgsg	501
AD-1103867.1	gsusgcgcGfgCfCfGfcuggugcau(L96)	346	asUfsgcaCfcAfGfgcggCfcGfcgcaesgsu	481
AD-1072433.1	gscsggccGfcCfUfGfgugcaguacu(L96)	347	asGfsuacUfgCfAfcagGfcGfgccgcsasc	482
AD-1103872.1	asgscgccAfuCfCfGfcgagcgccu(L96)	368	asAfsaggGfcUfCfagcgAfuGfgcgcusgsa	503
AD-1103889.1	gscscuccGfcGfCfAfgccugcagcu(L96)	410	asGfscugCfaGfGfcugcGfcGfgaggcsag	545
AD-1103864.1	gsascgugCfGfCfGfGfcgcccuggu(L96)	343	asAfscgaGfgCfGfgccgCfGcfacgucscsu	478
AD-1072464.1	gscscaugCfuCfGfGfccagagcacu(L96)	350	asGfsugcUfcUfGfgccgAfgCfauggcscsu	485
AD-1103862.1	asgsgacgUfgCfGfCfggccgcccgu(L96)	341	asCfsaggCfGfCfcgcgCfaCfguccuscsc	476

AD-1072637.1	cscsagcaGfaUfAfCfGCCUGCAGGU(L96)	383	asCfscugCfaGfGfcguaUfcUfgcuggsgsc	518
AD-1072420.1	csusgggcGfcGfGfAfauggaggau(L96)	328	asUfscuCfcAfUfguccGfcGfcccagscsc	463
AD-1072238.1	csasgcgcUfgGfGfAfacuggcacuu(L96)	302	asAfsugCfcAfGfuuccCfaGfcgucgsgsc	437
AD-1103866.1	csgsugcgCfGfCfCfGCCUGGUGCU(L96)	345	asGfscacCfaGfGfcggcCfGfGfcacgsusc	480
AD-1103873.1	usgsgggcCfcCfUfGfguggaacagu(L96)	369	asCfsuguUfcCfAfccagGfgGfccccasgsg	504
AD-1103869.1	gsusgcgcCfuCfGfCfcuccaccuu(L96)	353	asAfsnguGfgGfAfggcgAfgGfcgcacscsc	488
AD-1072588.1	gscscuggAfcGfAfGfgugaaggagu(L96)	378	asCfsuccUfuCfAfcucGfuCfcaggcsugsg	513
AD-1072544.1	csusggcaGfuGfUfAfccaggccggu(L96)	365	asCfscggCfcUfGfguacAfcUfgccagsgsc	500
AD-1103859.1	usgsgaggAfcGfUfGfcgcccgcgu(L96)	338	asGfscggCfcGfCfGcacGfuCfcuccasugsg	473
AD-1103853.1	csgsgacaUfgGfAfGfgacugcgcu(L96)	332	asGfscgcAfcGfUfcucCfaUfguccgscsg	467
AD-1103856.1	ascsauggAfgGfAfCfGugcgccgcu(L96)	335	asGfscgcCfGfCfAfcgucCfuCfcaugscsc	470
AD-1072607.1	gsgsagguGfcGfCfGfccaagcuggu(L96)	380	asCfscagCfuUfGfgcgGfcAfcuccsgsc	515
AD-1103860.1	gsgsaggaCfGfUfGfCfGcgccgcu(L96)	339	asGfsgcgGfcCfGfcgcaCfGfUfcuccsasuc	474
AD-1103884.1	gscsgaccCfcAfCfGfccaccccggu(L96)	405	asAfsaggGfgUfGfgcgGfgGfgucgcsasu	540
AD-1072551.1	gscscgccAfcUfGfUfgggcuccuu(L96)	372	asAfsaggAfgCfCfcacaGfuGfgcgccscsc	507
AD-1103874.1	cscscugGfuGfGfAfacaggccgcu(L96)	370	asCfsggcCfcUfGfuuccAfcCfagggscsc	505
AD-1103890.1	cscsugucCfcCfGfCfcccagccgu(L96)	411	asAfsaggCfuGfGfgcgGfgGfacaggsgsu	546
AD-1103881.1	ascscagcGfcCfGfCfcccugugcu(L96)	396	asGfsgcaCfaGfGfgcgGfcGfcuggugsgsc	531
AD-1103887.1	csgsugccUfcCfUfGfcuccgcgcu(L96)	408	asGfscgcGfgAfGfgcagGfaGfgcacgsgsg	543
AD-1103863.1	gsgsacguGfcGfCfGfgccgcccgu(L96)	342	asCfscagGfcGfGfcgcGfcAfcguccsusc	477
AD-1072509.1	gsgscuccUfcCfGfCfGaugccgau(L96)	359	asAfsucGfcAfUfcgagGfaGfgagccsgsc	494
AD-1103892.1	cscscagcCfGfUfCfCfuccugggggu(L96)	413	asAfscccCfaGfGfaggaCfGfGfcuggsgsc	548

AD-1103877.1	gscscgcuAfcAfGfGfagcgggcccu(L96)	375	asGfsggcCfcGfCfuccuGfuAfgcggsusg	510
AD-1103865.1	ascsgugcGfcGfGfCfcgccuggugu(L96)	344	asCfsaccAfgGfCfggccGfcGfcacguscsc	479
AD-1072649.1	gscsaggcCfgAfGfGfccuuccaggu(L96)	385	asCfscugGfaAfGfgccuCfgGfccugcsasg	520
AD-1103880.1	asgsccccUfgGfUfGfgaagacaugu(L96)	391	asCfsaugUfcUfUfccacCfaGfgggcuscsg	526
AD-1103878.1	cscsgaggCfcUfUfCfcaggcccgc(L96)	386	asGfscggGfcCfUfggaaGfgCfcucggscsc	521
AD-1072163.1	uscsacauUfcCfUfGfgcaggaugcu(L96)	293	asGfscauCfcUfGfccagGfaAfugugascs	428
AD-1072681.1	gscscgggCfuGfGfUfggagaagguu(L96)	394	asAfscuUfcUfCfcaccAfgCfccggscsc	529
AD-1072559.1	gsgscagCfcGfCfUfacaggagcgu(L96)	374	asCfsgcuCfcUfGfuagcGfgCfuggccsgsg	509
AD-1072538.1	asasgcgcCfuGfGfCfaguguaccu(L96)	364	asUfsgguAfcAfCfugccAfgGfcgcuuscsu	499
AD-1103876.1	cscsuggcCfgGfCfCfagccgcuacu(L96)	373	asGfsuagCfgGfCfuggcCfgGfccaggsgsa	508

Таблица 7. Выбранные немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи АРОЕ из таблицы 2, нацеленные на патогенный аллель АРОЕ4

Смысловая последовательность от 5' до 3'	SE Q ID NO:	Антисмысловая последовательность от 5' до 3'	SEQ ID NO:	Целевой участок смысловой цепи в NM_000041.4	Целевой участок антисмысловой цепи в NM_000041.4
CGCGGACAUGGAGGACGUGCU	59	AGCACGUCCUCCAUGUCCGCGCC	194	NM_000041.4_438-458_U20C_G21U_s	NM_000041.4_436-458_C1A_A2G_as
GCGGACAUGGAGGACGUGCGU	61	ACGCACGUCCUCCAUGUCCGCGC	196	NM_000041.4_439-459_U19C_C21U_s	NM_000041.4_437-459_G1A_A3G_as
CGGACAUGGAGGACGUGCGCU	62	AGCGCACGUCCUCCAUGUCCGCG	197	NM_000041.4_440-460_U18C_G21U_s	NM_000041.4_438-460_C1A_A4G_as

GGACAUGGAGGACGUGCG CGU	63	ACGCGCACGUCCUCCAUGUCC GC	198	NM_000041.4_441- 461_U17C_G21U_s	NM_000041.4_439- 461_C1A_A5G_as
GACAUGGAGGACGUGCGC GGU	64	ACCGCGCACGUCCUCCAUGUC CG	199	NM_000041.4_442- 462_U16C_C21U_s	NM_000041.4_440- 462_G1A_A6G_as
ACAUGGAGGACGUGCGCG GCU	65	AGCCGCGCACGUCCUCCAUGU CC	200	NM_000041.4_443- 463_U15C_C21U_s	NM_000041.4_441- 463_G1A_A7G_as
CAUGGAGGACGUGCGCGG CCU	66	AGGCCGCGCACGUCCUCCAUG UC	201	NM_000041.4_444- 464_U14C_G21U_s	NM_000041.4_442- 464_C1A_A8G_as
AUGGAGGACGUGCGCGGC CGU	67	ACGGCCGCGCACGUCCUCCA GU	202	NM_000041.4_445- 465_U13C_C21U_s	NM_000041.4_443- 465_G1A_A9G_as
UGGAGGACGUGCGCGGCC GCU	68	AGCGGCCGCGCACGUCCUCCA UG	203	NM_000041.4_446- 466_U12C_C21U_s	NM_000041.4_444- 466_G1A_A10G_as
GGAGGACGUGCGCGGCCG CCU	69	AGGCGGCCGCGCACGUCCUCC AU	204	NM_000041.4_447- 467_U11C_s	NM_000041.4_445- 467_A11G_as
GAGGACGUGCGCGGCCGC CUU	70	AAGGCGGCCGCGCACGUCCUC CA	205	NM_000041.4_448- 468_U10C_G21U_s	NM_000041.4_446- 468_C1A_A12G_as
AGGACGUGCGCGGCCGCC UGU	71	ACAGGCGGCCGCGCACGUCCU CC	206	NM_000041.4_449- 469_U9C_G21U_s	NM_000041.4_447- 469_C1A_A13G_as
GGACGUGCGCGGCCGCCU GGU	72	ACCAGGCGGCCGCGCACGUCC UC	207	NM_000041.4_450- 470_U8C_s	NM_000041.4_448- 470_A14G_as
GACGUGCGCGGCCGCCUG GUU	73	AACCAGGCGGCCGCGCACGUC CU	208	NM_000041.4_451- 471_U7C_G21U_s	NM_000041.4_449- 471_C1A_A15G_as

ACGUGCGCGGCCGCCUGG UGU	74	ACACCAGGCGGCCGCGCACGU CC	209	NM_000041.4_452- 472_U6C_C21U_s	NM_000041.4_450- 472_G1A_A16G_as
CGUGCGCGGCCGCCUGGU GCU	75	AGCACCAGGCGGCCGCGCACG UC	210	NM_000041.4_453- 473_U5C_A21U_s	NM_000041.4_451- 473_U1A_A17G_as
GUGCGCGGCCGCCUGGUG CAU	76	AUGCACCAGGCGGCCGCGCAC GU	211	NM_000041.4_454- 474_U4C_G21U_s	NM_000041.4_452- 474_C1A_A18G_as

Таблица 8. Выбранные модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи АРОЕ из таблицы 2, нацеленные на патогенный аллель АРОЕ4

Смысловая последовательность от 5' до 3'	SE Q ID NO:	Антисмысловая последовательность от 5' до 3'	SE Q ID NO:	Мишеневая последовательность mRNA от 5' до 3'	SEQ ID NO:
csgscggaCfaUfGfGfaggacgugcuL96	329	asGfscacGfuCfCfuccaUfgUfccgcgscsc	464	GGCGCGGACATGGAGGA CGTGCG	599
gscsggacAfuGfGfAfggacgugcgcuL96	331	asCfsgcaCfGfCfuccAfuGfuccgcsgsc	466	GCGCGGACATGGAGGAC GTGCGC	601
csgsgacaUfgGfAfGfgacgugcgcuL96	332	asGfscgcAfcGfUfccucCfaUfguccgscsg	467	CGCGGACATGGAGGACG TGCGCG	602
gsgsacauGfgAfGfGfacgugcgcgcuL96	333	asCfsgcgCfaCfGfuccuCfcAfuguccsgsc	468	GCGGACATGGAGGACGT GCGCGG	603
gsascaugGfaGfGfAfcgugcgcgguL96	334	asCfscgcGfcAfCfguccUfcCfaugucscsg	469	CGGACATGGAGGACGTG CGCGGC	604

ascsauggAfgGfAfCfGfugcgcgccuL96	335	asGfscgcCfGfAfCfGfugCfuCfcauguscsc	470	GGACATGGAGGACGTGC GCGGCC	605
csasuggaGfgAfCfGfugcgcgccuL96	336	asGfsgccGfcGfCfacguCfcUfcaugsusc	471	GACATGGAGGACGTGCG CGGCCG	606
asusggagGfaCfGfUfgcgcgccguL96	337	asCfsggcCfGfGfcacgUfcCfucausgsu	472	ACATGGAGGACGTGCGC GGCCGC	607
usgsgaggAfcGfUfGfcgcgccguL96	338	asGfscggCfcGfCfGcacGfuCfcuccasusg	473	CATGGAGGACGTGCGCG GCCGCC	608
gsgsaggaCfGfUfGfCfGcgccgcuL96	339	asGfsgcgGfcCfGfcgcaCfGfuccsasus	474	ATGGAGGACGTGCGCGG CCGCCT	609
gsasggacGfuGfCfGfcgcccguuL96	340	asAfsggcGfgCfCfGcgCfGfuccucscsa	475	TGGAGGACGTGCGCGGC CGCCTG	610
asgsgacgUfgCfGfCfGcgccgcuL96	341	asCfsaggCfGfCfGcgCfGfuccuscsc	476	GGAGGACGTGCGCGGCC GCCTGG	611
gsgsacguGfcGfCfGfGcgccugguL96	342	asCfscagGfcGfGfcgCfGfGfuccusc	477	GAGGACGTGCGCGGCCG CCTGGT	612
gsascgugCfGfCfGfGfcgcccugguL96	343	asAfscgaGfgCfGfGcgCfGfGfuccusc	478	AGGACGTGCGCGGCCGC CTGGTG	613
ascsgugcGfcGfGfCfGcgccugguL96	344	asCfsaccAfgGfCfGcgGfcGfGfuccusc	479	GGACGTGCGCGGCCGCC TGGTGC	614
csgsugcgCfGfCfCfGcgccugguL96	345	asGfscacCfaGfGfcgGcCfGfGfGfuccusc	480	GACGTGCGCGGCCGCCT GGTGCA	615

gsusgcgcGfgCfCfGfccuggugcauL96	346	asUfsgcaCfcAfGfgcggCfcGfcgcacsgsu	481	ACGTGCGCGGCCGCCTG GTGCAG	616
--------------------------------	-----	-----------------------------------	-----	-----------------------------	-----

Таблица 6. Данные скрининга 10 нМ *in vitro*

ИД дуплекса	Среднее	SD
AD-1072375.1	1,4	0,6
AD-1072352.1	2,4	0,3
AD-1072394.1	2,9	0,3
AD-1072721.1	3,2	0,5
AD-1072254.1	3,2	0,0
AD-1072189.1	3,5	0,3
AD-1072741.1	3,5	0,8
AD-1072382.1	3,7	1,0
AD-1072129.1	4,0	0,5
AD-1072514.1	4,2	0,3
AD-1072124.1	4,2	0,8
AD-1072337.1	4,3	0,6
AD-1072135.1	4,6	0,9
AD-1072745.1	4,7	1,1
AD-1072153.1	5,0	0,3
AD-1072520.1	5,7	1,2
AD-1072389.1	6,5	1,6
AD-1072716.1	6,5	1,3
AD-1072222.1	6,8	0,4
AD-1072367.1	7,1	1,0
AD-1103894.1	9,2	1,3
AD-1072651.1	9,2	0,8
AD-1072260.1	9,4	2,0
AD-1072265.1	9,4	0,9
AD-1072750.1	9,9	1,8
AD-1072142.1	10,1	1,3
AD-1072328.1	10,2	2,3
AD-1072198.1	10,3	1,7
AD-1072361.1	11,2	0,6
AD-1072526.1	11,4	1,5
AD-1072699.1	11,8	1,4
AD-1072711.1	11,8	4,0

AD-1103879.1	11,9	1,6
AD-1103849.1	12,1	0,4
AD-1072662.1	12,6	0,8
AD-1103883.1	12,7	3,2
AD-1072172.1	13,2	1,4
AD-1072158.1	15,4	5,8
AD-1072705.1	15,7	2,5
AD-1072147.1	16,6	0,7
AD-1072593.1	16,8	2,3
AD-1072115.1	17,0	0,4
AD-1072289.1	18,6	6,5
AD-1072283.1	18,9	1,6
AD-1103871.1	19,2	4,2
AD-1072183.1	20,2	0,5
AD-1072667.1	20,3	4,5
AD-1072614.1	20,4	1,7
AD-1072632.1	21,0	1,3
AD-1072211.1	21,2	7,2
AD-1072406.1	21,3	0,4
AD-1103882.1	21,9	0,9
AD-1103855.1	22,0	5,9
AD-1072726.1	22,8	1,5
AD-1103893.1	26,0	2,3
AD-1072736.1	31,5	5,0
AD-1072426.1	32,4	5,5
AD-1072506.1	33,7	6,4
AD-1072248.1	34,2	2,1
AD-1072203.1	35,4	3,7
AD-1103888.1	35,5	11,3
AD-1072243.1	35,8	0,6
AD-1103886.1	38,9	1,2
AD-1072347.1	39,4	3,1
AD-1072411.1	45,5	2,6
AD-1072319.1	53,0	17,3

AD-1103885.1	57,0	1,6
AD-1072488.1	57,3	4,4
AD-1072532.1	60,1	1,8
AD-1072493.1	60,5	5,4
AD-1072686.1	64,8	2,5
AD-1072656.1	66,4	7,3
AD-1103851.1	66,6	5,4
AD-1072216.1	66,6	5,1
AD-1072455.1	67,3	4,3
AD-1072581.1	68,5	9,7
AD-1072499.1	69,5	10,1
AD-1103854.1	70,4	4,7
AD-1072672.1	72,6	4,0
AD-1072644.1	73,6	5,8
AD-1103850.1	74,2	5,0
AD-1103875.1	74,5	2,4
AD-1072401.1	79,5	24,3
AD-1072438.1	79,5	5,7
AD-1072310.1	79,6	3,4
AD-1072277.1	81,9	5,0
AD-1103852.1	82,0	15,0
AD-1072483.1	86,5	3,1
AD-1072569.1	86,6	12,8
AD-1072473.1	87,1	5,6
AD-1103868.1	88,8	4,6
AD-1103858.1	88,9	4,4
AD-1103857.1	89,8	3,4
AD-1103861.1	90,3	6,5
AD-1103891.1	90,5	2,9
AD-1103870.1	92,2	5,7
AD-1103867.1	92,5	6,5
AD-1072433.1	92,5	6,5
AD-1103872.1	93,0	6,5
AD-1103889.1	93,6	3,6

AD-1103864.1	93,7	2,3
AD-1072464.1	94,1	6,3
AD-1103862.1	94,1	4,8
AD-1072637.1	94,7	12,4
AD-1072420.1	95,0	8,6
AD-1072238.1	95,4	5,0
AD-1103866.1	95,9	2,6
AD-1103873.1	96,5	5,7
AD-1103869.1	97,2	3,1
AD-1072588.1	97,8	5,4
AD-1072544.1	98,0	8,7
AD-1103859.1	98,0	6,2
AD-1103853.1	98,3	5,6
AD-1103856.1	99,3	5,1
AD-1072607.1	99,5	6,1
AD-1103860.1	99,6	16,5
AD-1103884.1	100,0	3,0
AD-1072551.1	101,2	3,1
AD-1103874.1	101,3	3,6
AD-1103890.1	103,4	3,4
AD-1103881.1	104,3	5,2
AD-1103887.1	104,9	2,6
AD-1103863.1	105,6	8,2
AD-1072509.1	106,5	19,7
AD-1103892.1	106,6	8,2
AD-1103877.1	106,9	12,2
AD-1103865.1	107,0	1,9
AD-1072649.1	108,5	3,9
AD-1103880.1	109,2	3,3
AD-1103878.1	110,2	5,8
AD-1072163.1	111,3	16,3
AD-1072681.1	114,6	6,8
AD-1072559.1	114,9	7,2
AD-1072538.1	119,3	8,0

AD-1103876.1	120,4	16,4
--------------	-------	------

Пример 2. Оценка *in vivo* на трансгенных мышах

В этом примере описаны способы оценки *in vivo* агентов APOE RNAi в модели болезни Альцгеймера у трансгенных мышей APPPS1-21. У этих мышей сверхэкспрессируется cDNA белка-предшественника амилоида человека (APP) со шведской мутацией (KM670/671NL) и мутантный PS1 с мутацией L166P. Эндогенный ген ApoE у этих мышей был заменен либо аллелем APOE3 человека, либо аллелем APOE4 человека (Huynh, *et al.* (2017) Neuron 96: 1013-1023).

Способность выбранных агентов dsRNA, разработанных и испытанных в примере 1, оценивают по их способности снижать уровень экспрессии APOE, например экспрессии APOE2, APOE3 и APOE4, в головном мозге и печени этих животных.

Вкратце, однопометникам интратекально или подкожно вводят разовую дозу представляющих интерес агентов dsRNA или плацебо. Через две недели после введения животных забивают, собирают образцы крови и тканей, включая кору головного мозга, спинной мозг, печень, селезенку и шейные лимфатические узлы.

Чтобы определить влияние введения агентов dsRNA, нацеленных на APOE, на уровень mRNA APOE, уровни mRNA определяют в образцах коры головного мозга и печени с помощью qRT-PCR.

Влияние введения агентов, нацеленных на APOE, на патологию болезни Альцгеймера в этой мышинной модели также оценивают, как описано Huynh, *et al.* (см. выше).

Однопометникам интратекально или подкожно вводят две дозы представляющих интерес агентов dsRNA или плацебо при рождении и в возрасте 8 недель. В возрасте 16 недель животных забивают, а образцы крови и тканей, включая кору головного мозга, спинной мозг, печень, селезенку и шейные лимфатические узлы, собирают и соответствующим образом обрабатывают.

Оценивают влияние агентов dsRNA на отложение бляшек A β , накопление A β , тотальную дистрофию нейритов, размер бляшек и распределение бляшек. Вкратце, для иммунофлуоресцентного анализа образцов тканей после фиксации и последующего погружения в сахарозу в течение не менее 24 часов с помощью микротомы собирают серийные коронарные срезы от лобной коры до каудального гиппокампа (правое полушарие). Три среза, содержащих гиппокамп, из правого полушария каждого мозга окрашивают красителем X34 для визуализации фибриллярных бляшек или коммерчески доступными антителами против амилоида- β (такими как 82E1) и соответствующими флуоресцентно-мечеными вторичными антителами. Для анализа окрашенные срезы сканируют с 20-кратным увеличением с помощью конфокального микроскопа. Захватываются случайные окна, содержащие кластеры бляшек, охватывающие одинаковую толщину в плоскости z для всех разделов. Используя подходящее программное обеспечение, объем маркеров определяется количественно при том же пороге. Каждая

точка данных представляет собой среднее значение из трех отдельных срезов ткани одного животного.

Пример 3. Оценка *in vivo* на гуманизированных мышах APOE

Гуманизированные мыши с нокаутом ApoE4 (приобретены у компании Jax; товарный номер 027894) для этого исследования были получены путем замены экзонов 2, 3 и большей части экзона 4 гена ApoE мыши последовательностью гена ApoE4 человека, включая экзоны 2, 3 и 4 (и некоторую последовательность 3'UTR) с использованием стандартных методов.

Для оценки эффективности представляющих интерес дуплексов *in vivo* в день 0, в возрасте 9-12 недель, самцам и самкам, анестезированным кетамин/ксилазином гомозиготным гуманизированным мышам с нокаутом APOE вводили однократную дозу 300 мкг AD-1204704, AD-1204705, AD-1204705, AD-1204706 AD-1204707, AD-1204708, AD-1204709, AD-1204710, AD-1204711, AD-1204712 или AD-1204713, или контроль искусственной CSF (aCSF) путем интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV) в правый желудочек с использованием шприца Гамильтона на 25 мкл и специальной изогнутой иглы диаметром 3,5 мм.

В таблице 9 представлен подробный список последовательностей немодифицированных смысловых и антисмысловых цепей APOE агентов, используемых в этом примере, а в таблице 10 представлен подробный список последовательностей модифицированных смысловых и антисмысловых цепей APOE агентов, используемых в этом примере.

На 14-й день после введения дозы животных умерщвляли, оба полушария головного мозга и печень собирали и быстро замораживали в жидком азоте. mRNA экстрагировали из ткани и анализировали методом RT-QPCR.

Результаты этого анализа представлены на фигурах 1A и 1B и демонстрируют, что однократная доза 300 мкг AD-1204704, AD-1204705, AD-1204708 или AD-1204712 сильно снижает экспрессию APOE в головном мозге (фиг. 1A) с меньшим влиянием на периферическую экспрессию APOE (фиг. 1B).

На фигуре 2 изображена корреляция активности агентов *in vitro* с активностью агентов *in vivo*. В частности, из 45 дуплексов, которые демонстрировали более 80% нокдауна в клетках Нер3В (при 10 нМ), 4 верхних дуплекса, идентифицированных в этом скрининге *in vitro*, показали наилучшую активность *in vivo* (агенты обведены кружком, то есть AD-1204704, AD-1204705, AD-1204708 или AD-1204712).

Таблица 9. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5' до 3'	SE Q ID NO:	Диапазон в NM_000041.4	Антисмысловая последовательность от 5' до 3'	SE Q ID NO:	Диапазон в NM_000041.4
AD-1204704	CAGGCAGGAAGAUGAAGGUUA	690	59-79	UAACCUUCAUCUUCCUGCCUGUG	700	57-79
AD-1204705	AGGAAGAUGAAGGUUCUGUGA	691	64-84	UCACAGAACCUUCAUCUUCCUGC	701	62-84
AD-1204706	UUCUGUGGGCUGCGUUGCUGA	692	77-97	UCAGCAACGCAGCCCACAGAACCC	702	75-97
AD-1204707	GCGUUGCUGGUCACAUUCCUA	693	88-108	UAGGAAUGUGACCAGCAACGCAG	703	86-108
AD-1204708	CACUGGGUCGCUUUUGGGAUA	694	209-229	UAUCCCAAAGCGACCCAGUGCC	704	207-229
AD-1204709	GUCGCUUUUGGGAUUACCUGA	695	215-235	UCAGGUAAUCCCAAAGCGACCCC	705	213-235
AD-1204710	UUUUGGGAUUACCUGCGCUGA	696	220-240	UCAGCGCAGGUAAUCCCAAAGC	706	218-240
AD-1204711	CCGCCUCAAGAGCUGGUUCGA	697	900-920	UCGAACCAGCUCUUGAGGGCGGC	707	898-920
AD-1204712	GACCCUAGUUUAAUAAAGAUUA	698	1130-1150	UAUCUUUAUUAACUAGGGUCCA	708	1128-1150

AD-1204713	CGGCCUCAGCGCCAUCCGCG A	699	639-659	UCGCGGAUGGCGCUGAGGCC GCG	709	637-659
------------	---------------------------	-----	---------	-----------------------------	-----	---------

Таблица 10. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5' до 3'	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность от 5' до 3'	SEQ ID NO:	Мишеневая последовательность mRNA от 5' до 3'	SEQ ID NO:
AD-1204704	csasggc(Ahd)GfgAfAfGfauga aggususa	710	VPusAfsaccUfuCfAfucuuCfcUf gccugsusg	720	CACAGGCAGGAAGAUG AAGGUUC	730
AD-1204705	asgsgaa(Ghd)AfuGfAfAfggu ucugusgsa	711	VPusCfsacaGfaAfCfcuucAfuCf uuccusgsc	721	GCAGGAAGAUGAAGGU UCUGUGG	731
AD-1204706	ususcug(Uhd)GfgGfCfUfgcg uugcusgsa	712	VPusCfsagcAfaCfGfcagcCfcAf cagaascsc	722	GGUUCUGUGGGCUGCG UUGCUGG	732
AD-1204707	gscsguu(Ghd)CfuGfGfUfcaca uuccsusa	713	VPusAfsggaAfuGfUfgaccAfgCf aacgcsasg	723	CUGCGUUGCUGGUCAC AUUCCUG	733
AD-1204708	csascug(Ghd)GfuCfGfCfuuuu gggasusa	714	VPusAfsuccCfaAfAfagcgAfcCf cagugscsc	724	GGCACUGGGUCGCUUU UGGGAUU	734
AD-1204709	gsuscgc(Uhd)UfuUfGfGfgau uaccusgsa	715	VPusCfsaggUfaAfUfccaAfaAf gcgacscsc	725	GGGUCGCUUUUGGGAU UACCUGC	735
AD-1204710	ususuug(Ghd)GfaUfUfAfccu gcgcusgsa	716	VPusCfsagcGfcAfGfguaaUfcCf caaaasgsc	726	GCUUUUGGGAUUACCU GCGCUGG	736
AD-1204711	cscsgcc(Uhd)CfaAfGfAfgcug guucsgsa	717	VPusCfsgaaCfcAfGfcucuUfgAf ggcggsgsc	727	GCCCGCCUCAAGAGCU GGUUCGA	737

AD-1204712	gsasccc(Uhd)AfgUfUfUfaaau aagasusa	718	VPusAfsucuUfuAfUfuuaaaCfuAf gggucscsa	728	UGGACCCUAGUUUAAU AAAGAUU	738
AD-1204713	csgsgcc(Uhd)CfaGfCfGfccau ccgcsgsa	719	VPusCfsgcgGfaUfGfgcgcUfgAf ggccgscsg	729	CGCGGCCUCAGCGCCA UCCGCGA	739

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Агент двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии АРОЕ, где агент dsRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов с 0 или 1 ошибочным спариванием части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, или нуклеотидную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную нуклеотидной последовательности полной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов с 0 или 1 ошибочным спариванием соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2, или нуклеотидную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную нуклеотидной последовательности полной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2, так что смысловая цепь комплементарна по меньшей мере 15 примыкающим друг к другу нуклеотидам в антисмысловой цепи.

2. Агент dsRNA по п.1, где агент dsRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 17 примыкающих друг к другу нуклеотидов с 0 или 1 ошибочным спариванием части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, или нуклеотидную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную нуклеотидной последовательности полной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 17 примыкающих друг к другу нуклеотидов с 0 или 1 ошибочным спариванием соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2, или нуклеотидную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную нуклеотидной последовательности полной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2, так что смысловая цепь комплементарна по меньшей мере 17 примыкающим друг к другу нуклеотидам в антисмысловой цепи.

3. Агент dsRNA по п.1, где агент dsRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 19 примыкающих друг к другу нуклеотидов с 0 или 1 ошибочным спариванием части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, или нуклеотидную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную нуклеотидной последовательности полной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 19 примыкающих друг к другу нуклеотидов с 0 или 1 ошибочным спариванием соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2, или нуклеотидную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную нуклеотидной последовательности полной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2, так что

смысловая цепь комплементарна по меньшей мере 19 примыкающим друг к другу нуклеотидам в антисмысловой цепи.

4. Агент dsRNA по п.1, где агент dsRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 21 примыкающих друг к другу нуклеотидов с 0 или 1 ошибочным спариванием части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, или нуклеотидную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную нуклеотидной последовательности полной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 21 примыкающих друг к другу нуклеотидов с 0 или 1 ошибочным спариванием соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2, или нуклеотидную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную нуклеотидной последовательности полной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2, так что смысловая цепь комплементарна по меньшей мере 21 примыкающим друг к другу нуклеотидам в антисмысловой цепи.

5. Агент dsRNA по любому из пп.1-4, где смысловая цепь и/или антисмысловая цепь представляют собой смысловую цепь и/или антисмысловую цепь, выбранную группы, включающей любую смысловую цепь и антисмысловую цепь из указанных в любой из таблиц 2-5 и 7-10.

6. Агент dsRNA по любому из пп.1-5, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов 57-79, 62-84, 75-97, 86-108, 207-229, 213-235, 218-240, 898-920, 1128-1150, 637-659 SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2.

7. Агент dsRNA по любому из пп.1-5, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов 57-79, 62-84, 207-229, 1128-1150 SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2.

8. Агент dsRNA по любому из пп.1-7, где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов отличающихся не более чем на три нуклеотида от любой из последовательностей нуклеотидов антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, включающей AD-1204704, AD-1204705, AD-1204705, AD-1204706 AD-1204707, AD-1204708, AD-1204709, AD-1204710, AD-1204711, AD-1204712 и AD-1204713.

9. Агент dsRNA по любому из пп.1-8, где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов отличающихся не более чем на три

нуклеотида от любой из последовательностей нуклеотидов антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, включающей AD-1204704, AD-1204705, AD-1204708 и AD-1204712.

10. Агент dsRNA по любому из пп.1-9, который подавляет экспрессию APOE4, но практически не подавляет экспрессию APOE2 и экспрессию APOE3.

11. Агент dsRNA по п.10, где смысловая цепь и/или антисмысловая цепь представляют собой смысловую цепь и/или антисмысловую цепь, выбранную группы, включающей любую смысловую цепь и антисмысловую цепь из указанных в любой из таблиц 7 и 8.

12. Агент dsRNA по любому из пп.1-11, где смысловая цепь, антисмысловая цепь или как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь конъюгированы с одним или несколькими липофильными фрагментами.

13. Агент dsRNA по п.12, где липофильный фрагмент конъюгирован в одном или нескольких положениях двухцепочечной области агента dsRNA.

14. Агент dsRNA по п.12 или 13, где липофильный фрагмент конъюгирован через линкер или носитель.

15. Агент dsRNA по любому из пп.12-14, где липофильность липофильного фрагмента, измеренная с помощью logKow, превышает 0.

16. Агент dsRNA по любому из пп.1-15, где гидрофобность агента двухцепочечной RNAi, измеренная несвязанной фракцией в анализе связывания с белками плазмы агента двухцепочечной RNAi, превышает 0,2.

17. Агент dsRNA по п.16, где анализ связывания с белками плазмы представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности с использованием белка сывороточного альбумина человека.

18. Агент dsRNA по любому из пп.1-17, где агент dsRNA содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

19. Агент dsRNA по п.18, где не более пяти нуклеотидов смысловой цепи и не более пяти нуклеотидов антисмысловой цепи представляют собой немодифицированные нуклеотиды.

20. Агент dsRNA по п.18, где все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

21. Агент dsRNA по любому из пп.18-20, где по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, включающей дезоксинуклеотид, 3'-концевой деокси-тимидин (dT) нуклеотид, 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, 2'-дезоксид-модифицированный нуклеотид, заблокированный нуклеотид, разблокированный нуклеотид, конформационно ограниченный нуклеотид, конформационно затрудненный этилом нуклеотид, абазический нуклеотид, 2'-амино-модифицированный нуклеотид, 2'-О-аллил-модифицированный нуклеотид, 2'-С-алкил-модифицированный нуклеотид, 2'-гидроксил-модифицированный нуклеотид, 2'-метоксиэтил-модифицированный нуклеотид, 2'-О-алкил-модифицированный нуклеотид, морфолинонуклеотид, фосфорамидат, нуклеотид, содержащий неприродное

основание, нуклеотид, модифицированный тетрагидропираном, нуклеотид, модифицированный 1,5-ангидрогекситолом, нуклеотид, модифицированный циклогексенилом, нуклеотид, содержащий 5'-фосфоротиоатную группу, нуклеотид, содержащий 5'-метилфосфонатную группу, нуклеотид, содержащий 5'-фосфат или 5'-миметик фосфата, нуклеотид, содержащий винилфосфонат, нуклеотид, содержащий аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), нуклеотид, содержащий S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), нуклеотид, содержащий 2-гидроксиметил-тетрагидрофуран-5-фосфат, нуклеотид, содержащий 2'-деокситимидин-3'-фосфат, нуклеотид, содержащий 2'-деоксигуанозин-3'-фосфат, и концевой нуклеотид, связанный с производным холестерина и бисдециламидной группой додекановой кислоты; и их комбинации.

22. Агент dsRNA по п.21, где модифицированный нуклеотид выбран из группы, включающей 2'-деокси-2'-фтор-модифицированный нуклеотид, 2'-дезоксимо-модифицированный нуклеотид, 3'-концевые дезокситимидиновые нуклеотиды (dT), заблокированный нуклеотид, абазический нуклеотид, 2'-амино-модифицированный нуклеотид, 2'-алкил-модифицированный нуклеотид, морфолинонуклеотид, фосфорамидат и нуклеотид, содержащий неприродное основание.

23. Агент dsRNA по п.21, где модифицированный нуклеотид содержит короткую последовательность 3'-концевых дезокситимидиновых нуклеотидов (dT).

24. Агент dsRNA по п.21, где модификации нуклеотидов представляют собой 2'-О-метил, GNA и 2'-фтор модификации.

25. Агент dsRNA по п.21, дополнительно содержащий по меньшей мере одну фосфоротиоатную межнуклеотидную связь.

26. Агент dsRNA по п.25, где агент dsRNA содержит 6-8 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

27. Агент dsRNA по любому из пп.1-26, где длина каждой цепи не превышает 30 нуклеотидов.

28. Агент dsRNA по любому из пп.1-27, где по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере из 1 нуклеотида.

29. Агент dsRNA по любому из пп.1-27, где по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

30. Агент dsRNA по любому из пп.1-29, где длина двухцепочечной области составляет 15-30 пар нуклеотидов.

31. Агент dsRNA по п.30, где длина двухцепочечной области составляет 17-23 пары нуклеотидов.

32. Агент dsRNA по п.30, где длина двухцепочечной области составляет 17-25 пар нуклеотидов.

33. Агент dsRNA по п.30, где длина двухцепочечной области составляет 23-27 пар нуклеотидов.

34. Агент dsRNA по п.30, где длина двухцепочечной области составляет 19-21 пару нуклеотидов.

35. Агент dsRNA по п.30, где длина двухцепочечной области составляет 21-23 пары нуклеотидов.

36. Агент dsRNA по любому из пп.1-35, где каждая цепь содержит 19-30 нуклеотидов.

37. Агент dsRNA по любому из пп.1-35, где каждая цепь содержит 19-23 нуклеотида.

38. Агент dsRNA по любому из пп.1-35, где каждая цепь содержит 21-23 нуклеотида.

39. Агент dsRNA по любому из пп.12-38, где один или несколько липофильных фрагментов конъюгированы с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере на одной цепи.

40. Агент dsRNA по п.39, где один или несколько липофильных фрагментов конъюгированы с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере на одной цепи через линкер или носитель.

41. Агент dsRNA по п.40, где внутренние положения включают все положения, кроме двух концевых положений с каждого конца по меньшей мере одной цепи.

42. Агент dsRNA по п.40, где внутренние положения включают все положения, кроме трех концевых положений с каждого конца по меньшей мере одной цепи.

43. Агент dsRNA по п.40-42, где внутренние положения исключают область сайта расщепления смысловой цепи.

44. Агент dsRNA по п.43, где внутренние положения включают все положения, кроме положений 9-12, считая от 5'-конца смысловой цепи.

45. Агент dsRNA по п.43, где внутренние положения включают все положения, кроме положений 11-13, считая от 3'-конца смысловой цепи.

46. Агент dsRNA по п.40-42, где внутренние положения исключают область сайта расщепления антисмысловой цепи.

47. Агент dsRNA по п.46, где внутренние положения включают все положения, кроме положений 12-14, считая от 5'-конца антисмысловой цепи.

48. Агент dsRNA по п.40-42, где внутренние положения включают все положения, кроме положений 11-13 на смысловой цепи, считая от 3'-конца, и положений 12-14 на антисмысловой цепи, считая от 5'-конца.

49. Агент dsRNA по любому из пп.12-48, где один или несколько липофильных фрагментов конъюгированы с одним или несколькими внутренними положениями, выбранными из группы, включающей положения 4-8 и 13-18 на смысловой цепи, и положения 6-10 и 15-18 на антисмысловой цепи, считая с 5'-конца каждой цепи.

50. Агент dsRNA по п.49, где один или несколько липофильных фрагментов конъюгированы с одним или несколькими внутренними положениями, выбранными из группы, включающей положения 5, 6, 7, 15 и 17 на смысловой цепи, и положения 15 и 17 на антисмысловой цепи, считая от 5'-конца каждой цепи.

51. Агент dsRNA по п.13, где положения в двухцепочечной области исключают область сайта расщепления смысловой цепи.

52. Агент dsRNA по любому из пп.12-51, где длина смысловой цепи составляет 21 нуклеотид, длина антисмысловой цепи составляет 23 нуклеотида, и липофильный фрагмент конъюгирован с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1, положением 7, положением 6 или положением 2 смысловой цепи или положением 16 антисмысловой цепи.

53. Агент dsRNA по п.52, где липофильный фрагмент конъюгирован с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1 или положением 7 смысловой цепи.

54. Агент dsRNA по п.52, где липофильный фрагмент конъюгирован с положением 21, положением 20 или положением 15 смысловой цепи.

55. Агент dsRNA по п.52, где липофильный фрагмент конъюгирован с положением 20 или положением 15 смысловой цепи.

56. Агент dsRNA по п.52, где липофильный фрагмент конъюгирован с положением 16 антисмысловой цепи.

57. Агент dsRNA по любому из пп.12-56, где липофильный фрагмент представляет собой алифатическое, алициклическое или полиалициклическое соединение.

58. Агент dsRNA по п.57, где липофильный фрагмент выбран из группы, включающей липид, холестерин, ретиноевую кислоту, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилоксигексанол, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, О3-(олеоил)литохолевую кислоту, О3-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин.

59. Агент dsRNA по п.58, где липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C4-C30 углеводородную цепь, необязательную функциональную группу, выбранную из группы, включающей гидроксил, амин, карбоновую кислоту, сульфонат, фосфат, тиол, азид и алкин.

60. Агент dsRNA по п.59, где липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C6-C18 углеводородную цепь.

61. Агент dsRNA по п.59, где липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C16 углеводородную цепь.

62. Агент dsRNA по п.61, где насыщенная или ненасыщенная углеводородная цепь C16 конъюгирована с положением 6, считая от 5'-конца цепи.

63. Агент dsRNA по любому из пп.12-60, где липофильный фрагмент конъюгирован через носитель, который заменяет один или несколько нуклеотидов во внутреннем положении(ях) или двухцепочечной области.

64. Агент dsRNA по п.63, где носитель представляет собой циклическую группу, выбранную из группы, включающей пирролидинил, пиразолинил, пиразолидинил, имидазолинил, имидазолидинил, пиперидинил, пиперазинил, [1,3]диоксоланил,

оксазолидинил, изоксазолидинил, морфолинил, тиазолидинил, изотиазолидинил, хиноксалинил, пиридазинонил, тетрагидрофуранил и декалинил; или представляет собой ациклический фрагмент, основанный на структуре серинола или структуре диэтаноламина.

65. Агент dsRNA по любому из пп.12-60, где липофильный фрагмент конъюгирован с двухцепочечным агентом iRNA через линкер, содержащий эфирную, тиоэфирную, мочевиновую, карбонатную, аминую, амидную, малеимид-тиоэфирную, дисульфидную, фосфодиэфирную, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.

66. Двухцепочечный агент iRNA по любому из пп.12-65, где липофильный фрагмент конъюгирован с азотистым основанием, сахарным фрагментом или межнуклеозидной связью.

67. Агент dsRNA по любому из пп.12-66, где липофильный фрагмент или нацеливающий лиганд конъюгирован с помощью биорасщепляемого линкера, выбранного из группы, включающей DNA, RNA, дисульфид, амид, функционализированные моносахариды или олигосахариды галактозамина, глюкозамина, глюкозы, галактозы, маннозы и их комбинации.

68. Агент dsRNA по любому из пп.12-67, где 3'-конец смысловой цепи защищен концевым кэпом, который представляет собой циклическую группу, выбранную из группы, включающей пирролидинил, пиразолинил, пиразолидинил, имидазолинил, имидазолидинил, пиперидинил, пиперазинил, [1,3]диоксоланил, оксазолидинил, изоксазолидинил, морфолинил, тиазолидинил, изотиазолидинил, хиноксалинил, пиридазинонил, тетрагидрофуранил и декалинил.

69. Агент dsRNA по любому из пп.12-68, дополнительно содержащий нацеливающий лиганд, который нацеливается на ткань печени.

70. Агент dsRNA по п.69, где нацеливающий лиганд представляет собой конъюгат GalNAc.

71. Агент dsRNA по любому из пп.1-70, дополнительно содержащий концевую хиральную модификацию, происходящую в первой межнуклеотидной связи на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связь атома фосфора в Sp конфигурации, концевую хиральную модификацию, происходящую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связь атома фосфора в Rp конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, происходящую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связь атома фосфора либо в Rp конфигурации, либо в Sp конфигурации.

72. Агент dsRNA по любому из пп.1-70, дополнительно содержащий концевую хиральную модификацию, происходящую в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связь атома фосфора в Sp конфигурации,

концевую хиральную модификацию, происходящую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связь атома фосфора в R_p конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, происходящую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связь атома фосфора либо в R_p, либо в S_p конфигурации.

73. Агент dsRNA по любому из пп.1-70, дополнительно содержащий

концевую хиральную модификацию, происходящую в первой, второй и третьей межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связь атома фосфора в S_p конфигурации,

концевую хиральную модификацию, происходящую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связь атома фосфора в R_p конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, происходящую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связь атома фосфора либо в R_p, либо в S_p конфигурации.

74. Агент dsRNA по любому из пп.1-70, дополнительно содержащий

концевую хиральную модификацию, происходящую в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связь атома фосфора в S_p конфигурации,

концевую хиральную модификацию, происходящую в третьей межнуклеотидной связи на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связь атома фосфора в R_p конфигурации,

концевую хиральную модификацию, происходящую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связь атома фосфора в R_p конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, происходящую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связь атома фосфора либо в R_p, либо в S_p конфигурации.

75. Агент dsRNA по любому из пп.1-70, дополнительно содержащий

концевую хиральную модификацию, происходящую в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связь атома фосфора в S_p конфигурации,

концевую хиральную модификацию, происходящую в первой и второй межнуклеотидных связях на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связь атома фосфора в R_p конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, происходящую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связь атома фосфора либо в R_p, либо в S_p конфигурации.

76. Агент dsRNA по любому из пп.1-75, дополнительно содержащий фосфат или имитатор фосфата на 5'-конце антисмысловой цепи.

77. Агент dsRNA по п.76, где имитатор фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

78. Агент dsRNA по любому из пп.1-77, где пара оснований в 1 положении 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса представляет собой пару оснований AU.

79. Агент dsRNA по любому из пп.1-78, где смысловая цепь имеет в общей сложности 21 нуклеотид и антисмысловая цепь имеет в общей сложности 23 нуклеотида.

80. Клетки, содержащие агент dsRNA по любому из пп.1-79.

81. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена, кодирующего APOE, содержащая агент dsRNA по любому из пп.1-79.

82. Фармацевтическая композиция, содержащая агент dsRNA по любому из пп.1-79 и липидный состав.

83. Способ ингибирования экспрессии гена APOE в клетке, включающий:

(а) приведение клетки в контакт с агентом dsRNA по любому из пп.1-79 или фармацевтической композицией по п.81 или 82; и

(б) выдерживание клетки, полученной на стадии (а), в течение времени, достаточного для деградации транскрипта mRNA гена APOE, тем самым ингибируя экспрессию гена APOE в клетке.

84. Способ по п.83, где клетка находится внутри организма субъекта.

85. Способ по п.84, где субъектом является человек.

86. Способ по любому из пп.83-85, где экспрессия APOE ингибируется по меньшей мере на 50%.

87. Способ по п.85, где субъект соответствует по меньшей мере одному диагностическому критерию APOE-ассоциированного нейродегенеративного заболевания.

88. Способ по п.85, где у субъекта имеется APOE-ассоциированное нейродегенеративное заболевание.

89. Способ по п.88, где APOE-ассоциированное нейродегенеративное заболевание представляет собой амилоид-β-опосредованное заболевание.

90. Способ по п.89, где амилоид-β-опосредованное заболевание выбрано из группы, включающей болезнь Альцгеймера (AD), синдром Дауна и церебральную амилоидную ангиопатию.

91. Способ по п.89, где APOE-ассоциированное нейродегенеративное заболевание представляет собой тау-опосредованное заболевание.

92. Способ по п.91, где тау-опосредованное заболевание представляет собой первичную таупатию или вторичную таупатию.

93. Способ по п.92, где первичная таупатия выбрана из группы, включающей лобно-височную деменцию (FTD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кордикобазальную дегенерацию (CBD), болезнь Пика (PiD), глобулярные глиальные таупатии (GGT), лобно-височную деменцию с паркинсонизмом (FTDP, FTDP-17), хроническую травматическую энцелопатию (СТЕ), кулачную деменцию, лобно-височную

долевую дегенерацию (FTLD), аргирофильную зерновую болезнь (AGD) и первичную возрастную таупатию (PART).

94. Способ по п.92, где вторичная таупатия выбрана из группы, включающей AD, болезнь Крейцфельда-Якоба, синдром Дауна и семейную британскую деменцию.

95. Способ лечения субъекта, у которого диагностировано APOE-ассоциированное нейродегенеративное заболевание, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества агента dsRNA по любому из пп.1-79 или фармацевтической композиции по п.81 или 82, тем самым излечивая субъекта.

96. Способ по п.95, где субъектом является человек.

97. Способ по п.95, где лечение включает улучшение по меньшей мере признака или симптома заболевания.

98. Способ по п.96, где лечение включает предотвращение прогрессирования заболевания.

99. Способ по п.95, где у субъекта диагностировано APOE-ассоциированное нейродегенеративное заболевание.

100. Способ по п.98, APOE-ассоциированное нейродегенеративное заболевание представляет собой амилоид- β -опосредованное заболевание.

101. Способ по п.100, где амилоид- β -опосредованное заболевание выбрано из группы, включающей болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и церебральную амилоидную ангиопатию.

102. Способ по п.98, где APOE-ассоциированное нейродегенеративное заболевание представляет собой тау-опосредованное заболевание.

103. Способ по п.102, где тау-опосредованное заболевание представляет собой первичную таупатию или вторичную таупатию.

104. Способ по п.103, где первичная таупатия выбрана из группы, включающей лобно-височную деменцию (FTD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кордикобазальную дегенерацию (CBD), болезнь Пика (PiD), глобулярные глиальные таупатии (GGT), лобно-височную деменцию с паркинсонизмом (FTDP, FTDP-17), хроническую травматическую энцелопатию (СТЕ), кулачную деменцию, лобно-височную долевую дегенерацию (FTLD), аргирофильную зерновую болезнь (AGD) и первичную возрастную таупатию (PART).

105. Способ по п.103, где вторичная таупатия выбрана из группы, включающей AD, болезнь Крейцфельда-Якоба, синдром Дауна и семейную британскую деменцию.

106. Способ предотвращения развития APOE-ассоциированного нейродегенеративного заболевания у субъекта, отвечающего по меньшей мере одному диагностическому критерию APOE-ассоциированного нейродегенеративного заболевания, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества агента dsRNA по любому из пп.1-79 или фармацевтической композиции по п.81 или 82, тем самым предотвращая развитие APOE-ассоциированного нейродегенеративного заболевания у

субъекта, отвечающего по меньшей мере одному диагностическому критерию АРОЕ-ассоциированного нейродегенеративного заболевания.

107. Способ по п.106, где субъектом является человек.

108. Способ по п.106, где у субъекта диагностировано АРОЕ-ассоциированное нейродегенеративное заболевание.

109. Способ по п.106, где АРОЕ-ассоциированное нейродегенеративное заболевание представляет собой амилоид- β -опосредованное заболевание.

110. Способ по п.105, где амилоид- β -опосредованное заболевание выбрано из группы, включающей болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и церебральную амилоидную ангиопатию.

111. Способ по п.106, где АРОЕ-ассоциированное нейродегенеративное заболевание представляет собой тау-опосредованное заболевание.

112. Способ по п.111, где тау-опосредованное заболевание представляет собой первичную таупатию или вторичную таупатию.

113. Способ по п.112, где первичная таупатия выбрана из группы, включающей лобно-височную деменцию (FTD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кордикобазальную дегенерацию (CBD), болезнь Пика (PiD), глобулярные глиальные таупатии (GGT), лобно-височную деменцию с паркинсонизмом (FTDP, FTDP-17), хроническую травматическую энцелопатию (СТЕ), кулачную деменцию, лобно-височную долевою дегенерацию (FTLD), аргирофильную зерновую болезнь (AGD) и первичную возрастную таупатию (PART).

114. Способ по п.112, где вторичная таупатия выбрана из группы, включающей AD, болезнь Крейтцфельда-Якоба, синдром Дауна и семейную британскую деменцию.

115. Способ по любому из пп.95-114, где агент dsRNA вводят субъекту в дозе от около 0,01 мг/кг до около 50 мг/кг.

116. Способ по любому из пп.95-115, где агент dsRNA вводят субъекту интратекально.

117. Способ по любому из пп.95-116, дополнительно включающий измерение уровня одного или нескольких белков АРОЕ2, АРОЕ3 и АРОЕ4.

118. Способ по любому из пп.95-117, дополнительно включающий введение субъекту дополнительного агента, подходящего для лечения или профилактики АРОЕ-ассоциированного нейродегенеративного заболевания.

119. Способ ингибирования экспрессии гена АРОЕ в астроците, включающий:

(а) приведение в контакт астроцита с агентом dsRNA по любому из пп.1-79 или фармацевтической композицией по п.81 или 82; и

(б) выдерживание подходящего для лечения или профилактики (а) в течение времени, достаточного для деградации транскрипта mRNA гена АРОЕ, тем самым ингибируя экспрессию гена АРОЕ в астроците.

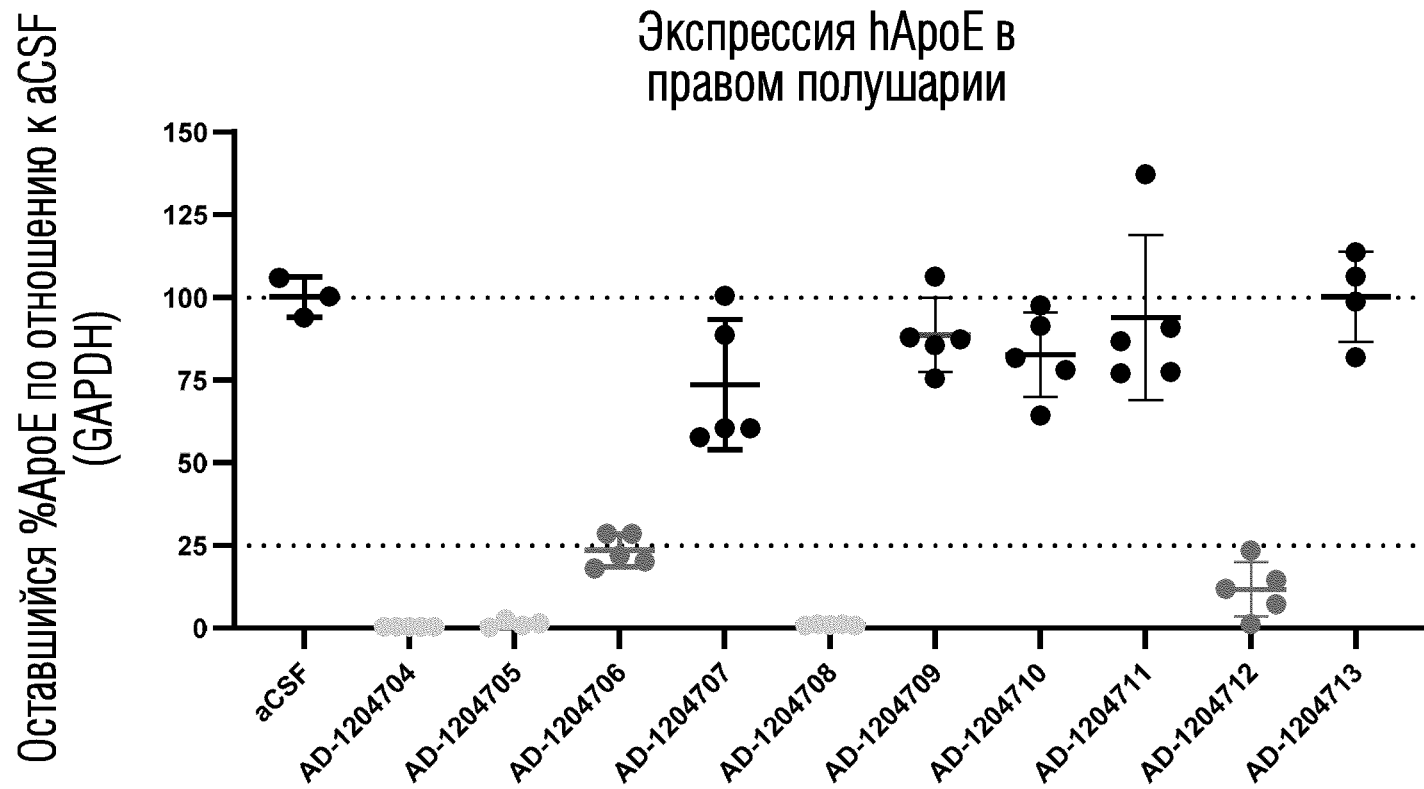
120. Способ по п.119, где астроцит находится внутри субъекта.

121. Способ по п.120, где субъектом является человек.

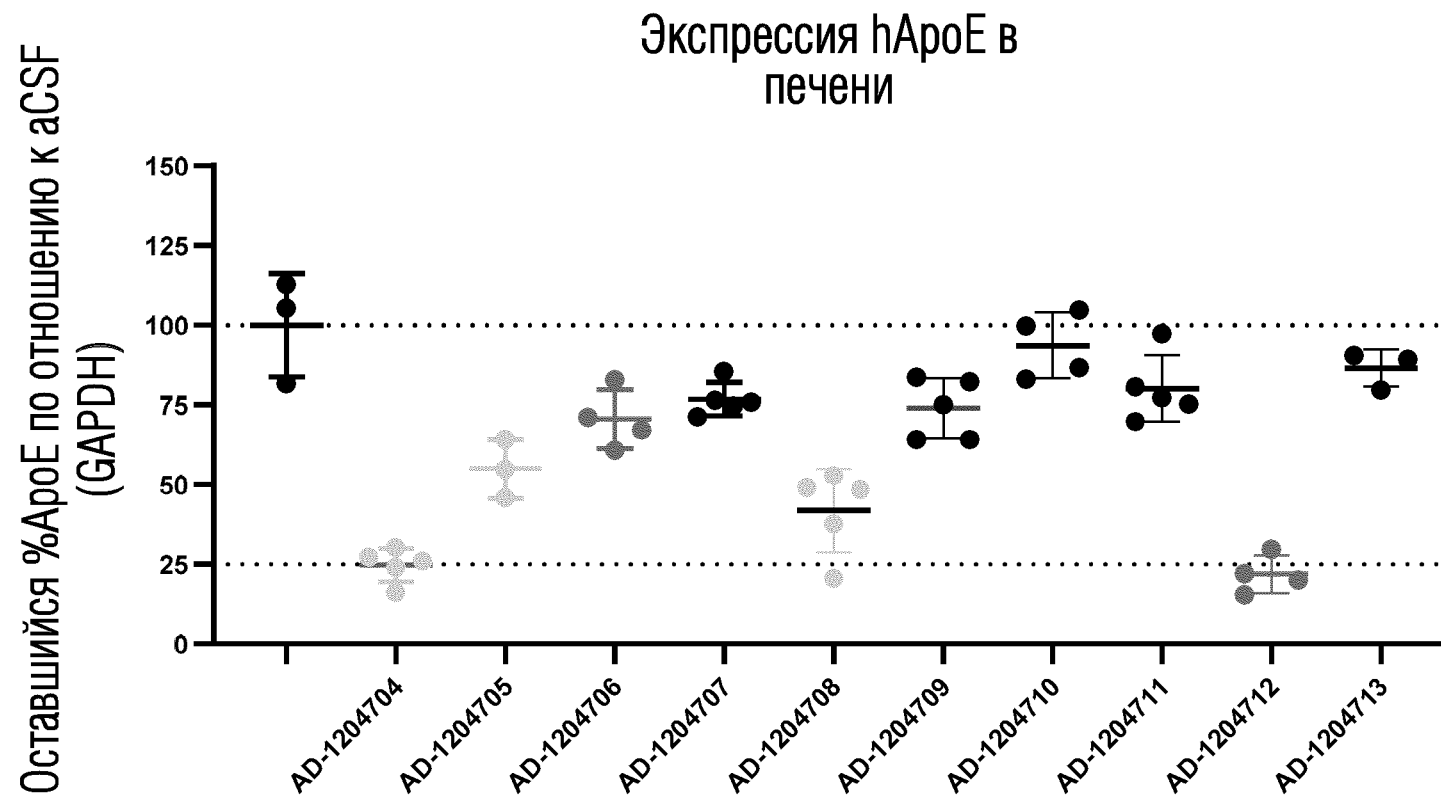
122. Способ по любому из пп.119-121, где приведение в контакт астроцита осуществляется путем интратекального введения фармацевтической композиции.

123. Способ по любому из пп.119-122, где антисмысловая цепь агента dsRNA содержит по меньшей мере 15 примыкающих друг к другу нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида от любой из последовательностей нуклеотидов антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, включающей AD-1204704, AD-1204705, AD-1204708 и AD-1204712.

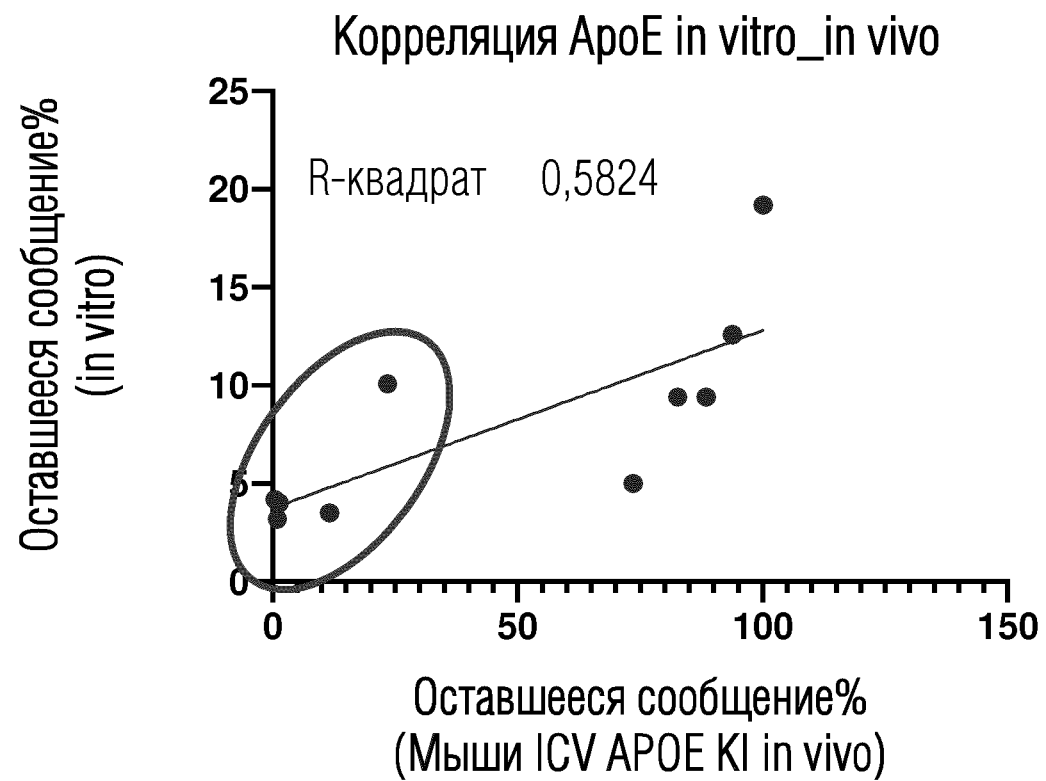
По доверенности



ФИГ. 1A



ФИГ. 1В



ФИГ. 2