

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390835** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.12

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.09.10

(54) АГЕНТЫ РНКи ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ DUX4, СОДЕРЖАЩИЕ ИХ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/077,272; 63/214,742

(32) 2020.09.11; 2021.06.24

(33) US

(86) PCT/US2021/049871

(87) WO 2022/056266 2022.03.17

(88) 2022.04.28

(71) Заявитель:
ЭРРОУХЕД ФАРМАСЬЮТИКЛЗ,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Дин Чжимин, Ван Дейк Джонатан, Ли
Сяокай, Николас Энтони, Шиненбек
Кейси М., Пэй Тао, Сюй Чжао, Ай
Тэн, Фан Сьюзан, Рамос-Хантер
Сьюзан (US)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В изобретении описаны агенты РНКи, композиции, включающие агенты РНКи, и способы ингибирования гена двойного гомеобокса 4 (DUX4). Агенты РНКи DUX4 и конъюгаты агентов РНКи, раскрытые в данном контексте, ингибируют экспрессию гена DUX4. Также описаны фармацевтические композиции, включающие один или более агентов РНКи DUX4, необязательно в смеси с одним или более дополнительными терапевтическими средствами. Доставка описанных агентов РНКи DUX4 в клетки скелетных мышц *in vivo* обеспечивает ингибирование экспрессии гена DUX4 и снижение уровней DUX4, что может обеспечить эффективное терапевтическое действие на субъектов, в том числе на человека, страдающего от определенных заболеваний, относящихся к скелетным мышцам, или расстройств, в том числе плечелопаточно-лицевой мышечной дистрофии (FSHD).

A1

202390835

202390835

A1

АГЕНТЫ РНКИ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ DUX4,
СОДЕРЖАЩИЕ ИХ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

5

Перекрестные ссылки на родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается приоритет на предварительную заявку
No. 63/077272, поданную 11 сентября 2020 г, и предварительную заявку No.
63/214742, поданную 24 июня 2021 г., содержание каждой из которых в полном
10 объеме включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Перечень последовательностей

В настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который
подан в формате ASCII и тем самым в полном объеме включен в качестве
ссылки. Копия ASCII названа 30679_SEQLIST.txt и ее размер составляет 58
15 т.п.н.

Область настоящего изобретения

Настоящее раскрытие относится к агентам интерферирующей РНК (РНКи),
например, к двухцепочечным агентам РНКи, предназначенным для
ингибирования экспрессии двойного гена гомеобокс 4 (double homeobox 4
20 (DUX4)), к композициям, которые содержат агенты РНКи DUX4 и способам их
применения.

Предпосылки создания настоящего изобретения

DUX4 представляет собой фактор транскрипции, обычно
экспрессирующийся во время эмбриогенеза, содержащий два гомеобоксных
25 домена, часть гена которых расположена в массиве макросателлитных повторов
D4Z4 на хромосоме 4. Обычно этот фактор в значительной степени
эпигенетически репрессирован за счет метилирования во всех тканях, кроме
яичка, и не проявляет известную физиологическую функцию в скелетных
мышцах взрослых субъектов. В условиях, когда DUX4 является
30 гипометилированным и дерепрессированным в скелетных мышцах, DUX4 может
экспрессироваться и активировать транскрипцию генов зародышевой линии,
иммунных медиаторов, ретротранспозонов, эндогенных ретровирусных
элементов и перичентромерных сателлитных последовательностей HSATII,
которые могут ускорять неправильную экспрессию нефизиологических

транскриптов, длинных некодирующих РНК или антисмысловых транскриптов, которые в конечном итоге вызывают внутриклеточные и внеклеточные сигнальные каскады, приводящие к дегенерации мышц. Именно экспрессия DUX4 вызывает мышечную патологию и слабость, ответственные за общие симптомы плече-лицевой мышечной дистрофии (FSHD), наиболее распространенной миопатии у взрослых, поражающей от 1 из 15 000 до 1 из 20 000 взрослых.

FSHD начинает развиваться относительно поздно, типичные диагнозы выявляются в возрасте от 20 до 30 лет, прогрессирование происходит медленно, тяжесть мышечной слабости нарастает от нескольких лет до десятилетий. Пациенты, страдающие от FSHD, обычно испытывают асимметричную мышечную слабость и потерю массы мышц лица, спины, плеч, брюшного пресса, тазобедренного пояса и ног, что приводит к значительному снижению качества жизни. Обе основные формы FSHD, называемые FSHD1 и FSHD2, вызваны пермиссивной экспрессией DUX4. FSHD1 развивается, когда длина массива макросателлитных повторов D4Z4 составляет менее 11 копий. Короткая длина массива приводит к недостаточным метилированию и эпигенетической репрессии и позволяет DUX4 спорадически экспрессироваться в миоядрах, что приводит к вышеупомянутым миотоксическим сигнальным каскадам. Развитие FSHD2 вызывается мутационными потерями функции в структурном поддержании гена шарнирного домена 1 хромосомы (SMCHD1), который частично отвечает за метилирование и репрессию массива макросателлитных повторов D4Z4. Снижение активности SMCHD1 приводит к эпигенетической дерепрессии и экспрессии DUX4.

Поскольку DUX4 обычно не экспрессируется во взрослых скелетных мышцах, не проявляет известную нормальную физиологическую функцию в скелетных мышцах, а при экспрессии приводит к усилению функциональной миотоксичности, он является сложной мишенью для большинства функциональных средств, таких как низкомолекулярные химические соединения или антитела. В настоящее время не существует эффективного лечения для устранения или предотвращения миотоксических эффектов экспрессии DUX4 в скелетных мышцах. Существует необходимость в терапевтическом средстве, способном ингибировать экспрессию DUX4 и предотвращать, останавливать

и/или вызвать регресс связанной с экспрессией DUX4 мышечной дегенерации, потери мышечной массы и мышечной слабости, связанных с FSHD.

Краткое описание вариантов осуществления настоящего изобретения

Существует потребность в новых агентах интерферирующей РНК (РНКи) (также называемых в данном контексте агентом РНКи, триггером РНКи или триггером), например, в агентах двухцепочечной РНКи, которые способны избирательно и эффективно ингибировать экспрессию двойного гомеобокса 4. (*DUX4*), прежде всего *in vivo*. Кроме того, существует потребность в композициях новых DUX4-специфических РНКи-агентов для лечения заболеваний или расстройств, таких как плечелопаточно-лицевая мышечная дистрофия (FSHD), развитие которых можно замедлить, по меньшей мере частично, за счет снижения уровней белка DUX4.

В основном, в настоящем описании предлагаются агенты РНКи DUX4, композиции, которые включают такие агенты РНКи, и способы ингибирования экспрессии гена *DUX4* *in vitro* и/или *in vivo* с использованием агентов РНКи и композиций, которые включают агенты РНКи, описанные в данном контексте. Агенты РНКи DUX4, описанные в данном контексте, способны избирательно и эффективно уменьшать, ингибировать или подавлять экспрессию гена *DUX4*.

Описанные агенты РНКи DUX4 можно использовать в способах терапевтического лечения (включая превентивное, терапевтическое или профилактическое лечение) симптомов и заболеваний, таких как FSHD, включая наиболее распространенные формы FSHD1 и FSHD2, обе из которых вызваны пермиссивной экспрессией DUX4. Способы, раскрытые в данном контексте, включают введение одного или более агентов РНКи DUX4 субъекту, например, человеку или животному, с использованием любых пригодных способов, известных в данной области, таких как, например, подкожное (п/к) введение, внутримышечное введение или внутривенное (в/в) введение.

В одном объекте настоящего изобретения предлагаются агенты РНКи для ингибирования экспрессии гена *DUX4*, где агент РНКи включает смысловую цепь (также называемую сопровождающей цепью) и антисмысловую цепь (также называемую направляющей цепью). Смысловая цепь и антисмысловая цепь могут представлять собой частично, в значительной степени или полностью комплементарные друг другу цепи. Длина каждой описанной в данном контексте смысловой цепи агента РНКи может составлять от 15 до 49 нуклеотидов. Длина

антисмысловых цепей агента РНКи, описанных в данном документе, может составлять от 17 до 49 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина смысловой и антисмысловой цепи независимо составляет от 17 до 26 нуклеотидов.

5 Смысловая и антисмысловая цепи могут характеризоваться как одинаковой, так и различной длиной. В некоторых вариантах смысловая и антисмысловая цепи независимо характеризуются длиной от 21 до 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах длина смысловой и антисмысловой цепей независимо составляет от 21 до 24 нуклеотидов. В некоторых вариантах длина как смысловой, так и
10 антисмысловой цепи составляет 21 нуклеотид. В некоторых вариантах длина антисмысловой цепи независимо составляет 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах длина смысловой цепей независимо составляет 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 или 49
15 нуклеотидов. Агенты РНКи, описанные в данном контексте, при доставке в клетку, экспрессирующую DUX4, такую как клетка скелетной мышцы (скелетное мышечное волокно), ингибируют экспрессию одного или нескольких транскриптов гена *DUX4* in vivo и/или in vitro.

 Агенты РНКи DUX4, описанные в данном контексте, направлены на ген двойного гомеобокса 4 (DUX4) (см., например, SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2, вариант 2 транскрипта homo sapiens). В некоторых вариантах агенты РНКи, раскрытые в настоящем документе, направлены на часть гена *DUX4*, характеризующегося любой из последовательностей, указанных в таблице 1.

 В другом объекте настоящего изобретения предлагаются фармацевтические композиции, которые включают один или более раскрытых агентов РНКи DUX4, которые способны избирательно и эффективно снижать экспрессию гена *DUX4*. Фармацевтические композиции, которые включают один или более агентов РНКи DUX4, описанных в данном контексте, можно вводить субъекту, такому как человек или животное, для лечения (включая превентивное, терапевтическое
25 или профилактическое лечение или ингибирование) симптомов и заболеваний, интенсивность симптомов которых можно снизить, по меньшей мере, частично за счет снижения уровня белка DUX4. Фармацевтические композиции, описанные в данном контексте, включают агент РНКи, способный ингибировать
30

экспрессию гена *DUX4*, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

Примеры смысловых цепей и антисмысловых цепей агента DUX4 РНКи, которые можно использовать в составе агента РНКи DUX4, представлены в таблицах 3 и таблицах 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 и таблице 5.4. Примеры дуплексов агента DUX4 RNAi представлены в таблицах 5.1, 5.2, 5.3 и 5.4. Примеры 19-членных нуклеотидных последовательностей тяжелой коры, которые могут состоять из смысловых цепей и антисмысловых цепей некоторых агентов DUX4 РНКи, описанные в данном контексте, или которые можно включать в них, представлены в таблице 2.

В одном объекте, описанном в данном контексте, предлагается агент РНКи для ингибирования экспрессии гена *DUX4*, содержащий:

(i) антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, отличающихся на 0 или 1 нуклеотид от любой из последовательностей, представленных в таблице 3 или таблице 5.4, и

(ii) смысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере частично является комплементарной антисмысловой цепи.

В другом объекте, описанном в данном контексте, предлагается агент РНКи, ингибирующий экспрессию гена *DUX4*, включающий

I. (i) антисмысловую цепь, включающую по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, отличающихся на 0 или 1 нуклеотид от любой из последовательностей, представленных в таблице 3 или таблице 5.4,

(ii) смысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере частично является комплементарной антисмысловой цепи,

(iii) направляющий лиганд, присоединенный к смысловой цепи, которая характеризуется сродством к клеткам скелетных мышц и/или к рецептору, присутствующему на клетках скелетных мышц, и

(iv) модулятор ФК/ФД, присоединенный к смысловой цепи.

В другом объекте, описанном в данном контексте, предлагается агент РНКи, ингибирующий экспрессию гена *DUX4*, включающий

II. (i) антисмысловую цепь, включающую по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, отличающихся на 0 или 1 нуклеотид от любой из последовательностей, представленных в таблице 3 или таблице 5.4,

(ii) смысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере частично является комплементарной антисмысловой цепи,

(iii) направляющий лиганд присоединен к смысловой цепи, которая характеризуется сродством к клеткам скелетных мышц и/или к рецептору, присутствующему на клетках скелетных мышц, где направляющий лиганд присоединен к 5'концу смысловой цепи, и

(iv) модулятор ФК/ФД присоединен к 3'концу смысловой цепи.

III. В другом объекте, описанном в данном контексте, предлагается агент РНКи, ингибирующий экспрессию гена *DUX4*, включающий

(i) антисмысловую цепь, включающую по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, отличающихся на 0 или 1 нуклеотид от любой из последовательностей, представленных в таблице 3 или таблице 5.4,

(ii) смысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере частично является комплементарной антисмысловой цепи,

(iii) направляющий лиганд характеризуется химической структурой, представленной в данном контексте в табл. 6.2 или 6.3, где направляющий лиганд присоединен к 5'концу смысловой цепи, и

(iv) модулятор ФК/ФД характеризуется химической структурой, представленной в данном контексте в табл. 6.5 или 6.7, где модулятор ФК/ФД присоединен к 3'концу смысловой цепи.

В еще одном объекте в описании представлены способы доставки агентов *DUX4* РНКи в клетки скелетных мышц субъекта, такого как млекопитающее, например человека, *in vivo*. В данном контексте также описаны композиции для применения в таких способах.

Один или более агентов *DUX4* РНКи можно доставлять в клетки-мишени или ткани-мишени с использованием технологии доставки олигонуклеотидов, известной в данной области техники. В некоторых вариантах настоящего изобретения агент *DUX4* РНКи доставляют в клетки или ткани при ковалентном присоединении агента РНКи к направляющей группе. В некоторых вариантах

направляющая группа может включать лиганд клеточного рецептора.

Направляющую группу можно присоединять к 3'- или 5'-концу смысловой цепи или антисмысловой цепи агента DUX4 РНКи. В некоторых вариантах

направляющая группа присоединена к 3'- или 5'-концу смысловой цепи. В

5 некоторых вариантах направляющая группа присоединена к 5'-концу смысловой цепи. В некоторых вариантах направляющая группа присоединена внутри нуклеотида на смысловой и/или антисмысловой цепи агента РНКи. В некоторых вариантах направляющая группа присоединена к агенту РНКи через линкер.

10 Типичные направляющие лиганды, которые характеризуются родством к клеткам скелетных мышц и/или рецепторам, присутствующим на клетках скелетных мышц (например, интегрину α -v-beta-6 (α v β 6)), представлены в табл. 6.2 и табл. 6.3 в данном контексте. Синтез и конъюгация определенных направляющих лигандов, пригодных для применения при получении агентов DUX4 РНКи, описаны в данном контексте, как показано в примере 1.

15 В некоторых вариантах в данном контексте описаны агенты DUX4 РНКи, которые конъюгированы с направляющими группами или направляющими лигандами, направляющими агент РНКи к клеткам скелетных мышц, при этом агенты РНКи можно селективно интернализировать либо с использованием опосредованного рецептором эндоцитоза или других способов.

20 В другом объекте в данном контексте описаны способы ингибирования экспрессии гена *DUX4* у субъекта, где способы включают введение субъекту количества агента DUX4 РНКи, способного ингибировать экспрессию гена *DUX4*, где агент DUX4 РНКи включает смысловую цепь и антисмысловую цепь, и где антисмысловая цепь включает последовательность любой одной

25 нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи, указанных в табл.2, табл. 3 или табл. 5.4. В еще одном объекте в данном контексте описаны способы лечения (включая профилактику, вмешательство и превентивное лечение)

заболеваний или симптомов, интенсивность которых можно снизить по меньшей мере частично при снижении уровней белка DUX4, при этом способы включают
30 введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, агента DUX4 РНКи, который включает антисмысловую цепь, включающую последовательность любой из последовательностей, указанных в табл.2, табл. 3 или табл. 5.4. Также описаны фармацевтические композиции для применения в таких способах.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи присоединен к одной или более связующих групп или других нуклеотидных групп или соединений, таких как фармакокинетические/фармакокинетические (ФК/ФД) модуляторы. ФК/ФД модуляторы могут повысить время циркуляции конъюгированного лекарственного средства и/или повысить активность агента РНКи благодаря улучшенному связыванию с клеточным рецептором, улучшенному клеточному захвату и/или другим средствам. Примеры ФК/ФД модуляторов, пригодных для применения с агентами DUX4 РНКи, описанными в данном контексте, представлены в табл. 6.5 и 6.7.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи конъюгируют с направляющей группой, связующей группой, ФК/ФД модулятором и/или другой нуклеотидной группой. В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи конъюгируют с направляющей группой, и ФК/ФД модулятором.

Применение агентов DUX4 РНКи позволяет использовать их в способах для терапевтического (включая профилактическое лечение или вмешательство) лечения заболеваний или нарушений, интенсивность которых можно снизить по меньшей мере частично за счет снижения уровней белка DUX4. В данном контексте описаны композиции для доставки агентов DUX4 РНКи в клетки скелетных мышц у субъекта. В некоторых вариантах описанные в данном контексте агенты DUX4 РНКи способны снизить экспрессию гена *DUX4* в параспинальной, лицевой, туловищной, брюшной тканях и тканях конечностей у субъекта, например, в трехглавой, двуглавой, четырехглавой, грудной, икроножной, камбаловидной мышцах, жевательной мышце, EDL (длинный разгибатель пальцев), ТА (передняя большеберцовая мышца), в трапецевидной мышце и/или диафрагме у субъекта.

В некоторых вариантах в данном контексте описаны способы лечения (включая профилактику или вмешательство) патологического состояния, опосредованного по меньшей мере частично экспрессией DUX4, где способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества агента РНКи, который включает смысловую цепь, включающую любую из последовательностей, указанных в табл. 2, табл. 4.1, табл. 4.2, табл. 4.3, табл. 4.4, табл. 4.5, табл. 4.6 или табл. 5.4.

В некоторых вариантах в данном контексте описаны способы лечения (включая профилактику или вмешательство) патологического состояния,

опосредованного по меньшей мере частично экспрессией DUX4, такого как FSHD, где способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества агента DUX4 РНКи, который включает смысловую цепь, включающую любую из последовательностей, указанных в табл. 4.1, табл. 4.2, табл. 4.3, табл. 4.4, табл. 4.5, табл. 4.6 или табл. 5.4, и антисмысловую цепь, включающую любую из последовательностей, указанных в табл. 3.

В некоторых вариантах в данном контексте описаны способы ингибирования экспрессии гена *DUX4*, описанного в данном контексте, где способы включают введение субъекту агента DUX4 РНКи, который включает смысловую цепь, включающую последовательность нуклеотидного основания любой из последовательностей, указанных в табл. 4.1, табл. 4.2, табл. 4.3, табл. 4.4, табл. 4.5, табл. 4.6 или табл. 5.4, и антисмысловую цепь, включающую любую из последовательностей, указанных в табл. 3 или табл. 5.4. В некоторых вариантах в данном контексте описаны способы ингибирования экспрессии гена *DUX4*, описанного в данном контексте, где способы включают введение субъекту агента DUX4 РНКи, который включает смысловую цепь, включающую модифицированную последовательность любой из последовательностей, указанных в табл. 4.1, табл. 4.2, табл. 4.3, табл. 4.4, табл. 4.5, табл. 4.6 или табл. 5.4, указанных в данном контексте, и антисмысловую цепь, включающую модифицированную последовательность любой из последовательностей, указанных в табл. 3 или табл. 5.4.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте, включает антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности нуклеотидных оснований или включает последовательность нуклеотидных оснований, отличающуюся на 0 или 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности (5' → 3'), выбранной из группы, состоящей из:

UAGAAUUUCACGGAAGAACAG (SEQ ID NO:164),
 UGAAACCAGAUUCUGAAUCCUG (SEQ ID NO:162),
 UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCU (SEQ ID NO:163) и
 UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCC (SEQ ID NO:169).

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте, включает антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности нуклеотидных оснований или включает последовательность нуклеотидных оснований, отличающуюся на не более, чем 1 нуклеотидное

основание от нуклеотидной последовательности ($5' \rightarrow 3'$), выбранной из группы, состоящей из:

UAGAAUUUCACGGAAGAACAG (SEQ ID NO:164),
 UGAAACCAGAUCUGAAUCCUG (SEQ ID NO:162),
 5 UUGAAACCAGAUCUGAAUCCU (SEQ ID NO:163) и
 UUGAAACCAGAUCUGAAUCCC (SEQ ID NO:169),

где все или практически все нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте,
 10 включает антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из
 последовательности нуклеотидных оснований или включает последовательность
 нуклеотидных оснований, отличающуюся на 0 или 1 нуклеотид от нуклеотидной
 последовательности ($5' \rightarrow 3'$), выбранной из группы, состоящей из:

UAGAAUUUCACGGAAGAACAG (SEQ ID NO:164),
 15 UGAAACCAGAUCUGAAUCCUG (SEQ ID NO:162),
 UUGAAACCAGAUCUGAAUCCU (SEQ ID NO:163) и
 UUGAAACCAGAUCUGAAUCCC (SEQ ID NO:169),

где соответствующая указанная выше последовательность расположена в
 положениях 1-21 ($5' \rightarrow 3'$) антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте,
 20 включает антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из
 последовательности нуклеотидных оснований или включает последовательность
 нуклеотидных оснований, отличающуюся на не более, чем 1 нуклеотид от
 нуклеотидной последовательности ($5' \rightarrow 3'$), выбранной из группы, состоящей
 25 из:

usAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:82),
 cPrpusAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:84),
 cPrpusAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:100),
 cPrpusAfsGfsaauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:101),
 30 cPrpusGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:97),
 cPrpusGfsasAfaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:99),
 cPrpusGfsasAfaCfcAfgAfuCfuGfaAfuCfcUfsg (SEQ ID NO:75),
 usGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:96),
 cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsu (SEQ ID NO:76),

cPrpusUfsgsaaaccagaUfcUfgAfauccsc (SEQ ID NO:89),

cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsc (SEQ ID NO:87),

где а, с, g, и u представляют собой 2'-О-метил аденозин, цитидин, гуанозин и уридин, соответственно, Af, Cf, Gf и Uf означают 2'-фтор аденозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно, сPrpu означает 5'-циклопропилфосфонат-2'-О-метил уридин; и s означает фосфоротиоатную связь, и где смысловая цепь по меньшей мере в основном является комплементарной антисмысловой цепи.

Специалисту в данной области техники представляется очевидным, что включение фосфоротиоантной связи, как показано в модифицированных нуклеотидных последовательностях, описанных в данном контексте, заменяет фосфодиэфирную связь, которая обычно присутствует в олигонуклеотидах.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте, включает

- (i) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') usAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:82), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') cuguucuuCfCfGfugaaauucua (SEQ ID NO:149),
- (ii) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') cPrpusAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:84), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') cuguucuuCfCfGfugaaauucua (SEQ ID NO:149),
- (iii) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') cPrpusAfsgsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:100), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности

нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность ($5' \rightarrow 3'$)

cuguucuuCfCfGfugaaaauucua (SEQ ID NO:149),

- (iv) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность ($5' \rightarrow 3'$) cPrpusAfsGfsaauiucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:101), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность ($5' \rightarrow 3'$) cuguucuuCfCfGfugaaaauucua (SEQ ID NO:149),
- (v) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность ($5' \rightarrow 3'$) cPrpusGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:97), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность ($5' \rightarrow 3'$) caggauucAfGfAfucugguuucua (SEQ ID NO:147),
- (vi) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность ($5' \rightarrow 3'$) cPrpusGfsasAfaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:99), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность ($5' \rightarrow 3'$) caggauucAfGfAfucugguuucua (SEQ ID NO:147),
- (vii) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность ($5' \rightarrow 3'$) cPrpusGfsasAfaCfcAfgAfuCfuGfaAfuCfcUfsg (SEQ ID NO:75), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований

или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') caggauucAfGfAfucugguuuc (SEQ ID NO:147),

(viii) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') usGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:96), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') caggauucAfGfAfucugguuuc (SEQ ID NO:147),

(ix) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsu (SEQ ID NO:76), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') aggauucaGfAfUfcugguuuc (SEQ ID NO:148),

(x) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') cPrpusUfsgsaaccagaUfcUfgAfauccsc (SEQ ID NO:89), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') gggauucaGfAfUfcugguuuc (SEQ ID NO:156) или

(xi) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsc (SEQ ID NO:87), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований

или включает модифицированную нуклеотидную последовательность
(5' → 3') gggauucaGfaUfCfugguuucaa (SEQ ID NO:159),

где а, с, g, и u представляют собой 2'-О-метил аденозин, цитидин, гуанозин
и уридин, соответственно, Af, Cf, Gf и Uf означают 2'-фтор аденозин, цитидин,
5 гуанозин и уридин соответственно, cPrpu означает 5'-циклопропил фосфонат-2'-
О-метил уридин, и s означает фосфоротиоатную связь.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте,
включает

(xii) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из
10 последовательности модифицированных нуклеотидных оснований
или включает последовательность модифицированных нуклеотидных
оснований (5' → 3'), usAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID
NO:82), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из
последовательности модифицированных нуклеотидных оснований
15 или включает модифицированную нуклеотидную последовательность
(5' → 3') cuguucuuCfCfGfugaauucua (SEQ ID NO:149),

(xiii) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из
последовательности модифицированных нуклеотидных оснований
или включает последовательность модифицированных нуклеотидных
20 оснований (5' → 3'), cPrpusAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID
NO:84), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из
последовательности модифицированных нуклеотидных оснований
или включает модифицированную нуклеотидную последовательность
(5' → 3') cuguucuuCfCfGfugaauucua (SEQ ID NO:149),

25 (xiv) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из
последовательности модифицированных нуклеотидных оснований
или включает последовательность модифицированных нуклеотидных
оснований (5' → 3'), cPrpusAfsgsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID
NO:100), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из
30 последовательности модифицированных нуклеотидных оснований
или включает модифицированную нуклеотидную последовательность
(5' → 3') cuguucuuCfCfGfugaauucua (SEQ ID NO:149),

(xv) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из
последовательности модифицированных нуклеотидных оснований

- или включает последовательность модифицированных нуклеотидных оснований ($5' \rightarrow 3'$), cPrpusAfsGfsaauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:101), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований
- 5 или включает модифицированную нуклеотидную последовательность ($5' \rightarrow 3'$) cuguucuuCfCfGfugaauuucua (SEQ ID NO:149),
- (xvi) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает последовательность модифицированных нуклеотидных
- 10 оснований ($5' \rightarrow 3'$), cPrpusGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:97), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность ($5' \rightarrow 3'$) caggauucAfGfAfucugguuuca (SEQ ID NO:147).
- 15 (xvii) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает последовательность модифицированных нуклеотидных оснований ($5' \rightarrow 3'$), cPrpusGfsasAfaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:99), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из
- 20 последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность ($5' \rightarrow 3'$) caggauucAfGfAfucugguuuca (SEQ ID NO:147).
- (xviii) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований
- 25 или включает последовательность модифицированных нуклеотидных оснований ($5' \rightarrow 3'$), cPrpusGfsasAfaCfcAfgAfuCfuGfaAfuCfcUfsg (SEQ ID NO:75), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную
- 30 последовательность ($5' \rightarrow 3'$) caggauucAfGfAfucugguuuca (SEQ ID NO:147).
- (xix) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает последовательность модифицированных нуклеотидных

- оснований ($5' \rightarrow 3'$), usGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:96), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность ($5' \rightarrow 3'$) caggauucAfGfAfucugguuuc (SEQ ID NO:147),
- 5 (xx) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает последовательность модифицированных нуклеотидных оснований ($5' \rightarrow 3'$), cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsu
- 10 (SEQ ID NO:76), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность ($5' \rightarrow 3'$) aggauucaGfAfUfcugguuuc (SEQ ID NO:148);
- 15 (xxi) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает последовательность модифицированных нуклеотидных оснований ($5' \rightarrow 3'$) cPrpusUfsgsaaaccagaUfcUfgAfauccsc (SEQ ID NO:89), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из
- 20 последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность ($5' \rightarrow 3'$) gggauucaGfAfUfcugguuuc (SEQ ID NO:156),
- (xxii) антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований
- 25 или включает последовательность модифицированных нуклеотидных оснований ($5' \rightarrow 3'$) cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsc (SEQ ID NO:87),), и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из последовательности модифицированных нуклеотидных оснований или включает модифицированную нуклеотидную последовательность
- 30 ($5' \rightarrow 3'$) gggauucaGfAfUfcugguuuc (SEQ ID NO:159);

где а, с, g, и u представляют собой 2'-О-метил аденозин, цитидин, гуанозин и уридин, соответственно, Af, Cf, Gf и Uf означают 2'-фтор аденозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно, cPrpu означает 5'-циклопропил фосфонат-2'-О-метил уридин, и s означает фосфоротиоатную связь, и где соответствующая

смысловая цепь дополнительно включает инвертированный остаток, лишенный азотистого основания, на 3'-конце нуклеотидной последовательности и 5'-конце нуклеотидной последовательности, и включает смысловую цепь, которая также включает направляющий лиганд, который ковалентно присоединен к

5 инвертированному остатку, лишенному азотистого основания, на 5'-конце смысловой цепи, где направляющий лиганд характеризуется сродством к клеткам скелетных мышц и/или рецептору, присутствующему на клетках скелетных мышц, и где смысловая цепь дополнительно включает модулятор ФК/ФД, который ковалентно присоединен к инвертированному остатку, 10 лишенному азотистого основания на 3'-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте, включает антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит или включает последовательность нуклеотидов отличающуюся не более, чем на 0 или 1 нуклеотид от следующих нуклеотидных последовательностей (5' → 3')

15 UAGAAUUUCACGGAAGAACAG (SEQ ID NO:164),
UGAAACCAGAUUCUGAAUCCUG (SEQ ID NO:162),
UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCU (SEQ ID NO:163) и
UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCC (SEQ ID NO:169),

где агент DUX4 РНКи дополнительно включает смысловую цепь, которая 20 по меньшей мере частично является комплементарной с антисмысловой цепью, и где все или в основном все нуклеотиды как в антисмысловой цепи, так и в смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте, включает антисмысловую цепь, которая включает, в основном состоит или 25 состоит из последовательности нуклеотидов, отличающейся на 0 или 1 нуклеотид от одной из следующих нуклеотидных последовательностей (5' → 3'):

UAGAAUUUCACGGAAGAACAG (SEQ ID NO:164),
UGAAACCAGAUUCUGAAUCCUG (SEQ ID NO:162),
UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCU (SEQ ID NO:163) и
30 UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCC (SEQ ID NO:169),

где агент DUX4 РНКи дополнительно включает смысловую цепь, которая по меньшей мере частично является комплементарной с антисмысловой цепью, и где все или в основном все нуклеотиды как в антисмысловой цепи, так и в смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, и где смысловая

цепь дополнительно включает инвертированный остаток, лишенный азотистого основания, на 3'-конце нуклеотидной последовательности и 5'-конце нуклеотидной последовательности, и включает смысловую цепь, которая также включает направляющий лиганд на 5'-конце смысловой цепи, который

5 ковалентно присоединен к инвертированному остатку, лишенному азотистого основания, и где направляющий лиганд характеризуется сродством к клеткам скелетных мышц и/или рецептору, присутствующему на клетках скелетных мышц.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте,

10 включает антисмысловую цепь, которая включает, в основном состоит или состоит из последовательности нуклеотидов, отличающейся на 0 или 1 нуклеотид от одной из следующих нуклеотидных последовательностей (5' → 3'):

UAGAAUUUCACGGAAGAACAG (SEQ ID NO:164),

UGAAACCAGAUUCUGAAUCCUG (SEQ ID NO:162),

15 UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCU (SEQ ID NO:163) и

UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCC (SEQ ID NO:169);

где агент DUX4 РНКи дополнительно включает смысловую цепь, которая по меньшей мере частично является комплементарной антисмысловой цепи, где все нуклеотиды или в основном все нуклеотиды как в антисмысловой цепи, так и

20 в смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, и где смысловая цепь дополнительно включает инвертированный остаток, лишенный азотистого основания, на 3'-конце нуклеотидной последовательности и 5'-конце нуклеотидной последовательности, и включает смысловую цепь, которая также включает направляющий лиганд, который ковалентно присоединен к 5'-концу,

25 где направляющий лиганд характеризуется сродством к клеткам скелетных мышц и/или рецептору, присутствующему на клетках скелетных мышц, и смысловая цепь дополнительно включает модулятор ФК/ФД, который ковалентно присоединен к инвертированному остатку, лишенному азотистого основания, на 3'-конце, и где соответствующая последовательность

30 антисмысловой цепи расположена в положениях 1-21 антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте, включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, где антисмысловая цепь и смысловая цепь состоит, в основном состоит из нуклеотидных последовательностей или включает нуклеотидные последовательности, которые

отличаются на 0 или 1 нуклеотид от одной из следующих пар нуклеотидных последовательностей (5' → 3'):

UAGAAUUUCACGGAAGAACAG (SEQ ID NO:164) и
CUGUUCUUCCGUGAAAUUCUA (SEQ ID NO:183), или

5 UGAAACCAGAUUCUGAAUCCUG (SEQ ID NO:162) и
CAGGAUUCAGAUUCUGGUUUCA (SEQ ID NO:181), или

UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCU (SEQ ID NO:163) и
AGGAUUCAGAUUCUGGUUUCUA (SEQ ID NO:182) или

10 UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCC (SEQ ID NO:169) и
GGGAUUCAGAUUCUGGUUUCUA (SEQ ID NO:189),

и где все нуклеотиды или в основном все нуклеотиды как в антисмысловой цепи, так и в смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте, включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, где антисмысловая цепь и
15 смысловая цепь состоит, в основном состоит из нуклеотидных последовательностей или включает нуклеотидные последовательности, которые отличаются на 0 или 1 нуклеотид от одной из следующих пар нуклеотидных последовательностей (5' → 3'):

UAGAAUUUCACGGAAGAACAG (SEQ ID NO:164) и
20 CUGUUCUUCCGUGAAAUUCUA (SEQ ID NO:183), или

UGAAACCAGAUUCUGAAUCCUG (SEQ ID NO:162) и
CAGGAUUCAGAUUCUGGUUUCA (SEQ ID NO:181), или

UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCU (SEQ ID NO:163) и
AGGAUUCAGAUUCUGGUUUCUA (SEQ ID NO:182), или

25 UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCC (SEQ ID NO:169) и
GGGAUUCAGAUUCUGGUUUCUA (SEQ ID NO:189),

и где все нуклеотиды или в основном все нуклеотиды как в антисмысловой цепи, так и в смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, и где смысловая цепь дополнительно включает инвертированный остаток,
30 лишенный азотистого основания, на 3'-конце нуклеотидной последовательности и 5'-конце соответствующей нуклеотидной последовательности, и где смысловая цепь также включает направляющий лиганд, который ковалентно присоединен к инвертированному лишенному нуклеотидного основания остатку на 5'-конце, где направляющий лиганд характеризуется сродством к клеткам скелетных

мышц и/или рецептору, присутствующему на клетках скелетных мышц, и где смысловая цепь также включает модулятор ФК/ФД, который ковалентно присоединен к инвертированному остатку, лишенному азотистого основания, на 3'-конце.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте, включает антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из модифицированных нуклеотидных последовательностей или включает модифицированную нуклеотидную последовательность, которая отличается на 0 или 1 нуклеотид от одной из следующих нуклеотидных последовательностей (5' → 3'):

usAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:82),
 cPrpusAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:84),
 cPrpusAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:100),
 cPrpusAfsGfsaauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:101),
 cPrpusGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:97),
 cPrpusGfsasAfaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:99),
 cPrpusGfsasAfaCfcAfgAfuCfuGfaAfuCfcUfsg (SEQ ID NO:75),
 usGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:96),
 cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsu (SEQ ID NO:76),
 cPrpusUfsgsaaaccagaUfcUfgAfaUfcCfsc (SEQ ID NO:89),
 cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsc (SEQ ID NO:87),

где а, с, g, и u представляют собой 2'-О-метил аденозин, цитидин, гуанозин и уридин, соответственно, Af, Cf, Gf и Uf означают 2'-фтор аденозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно, cPrpu означает 5'-циклопропил фосфонат-2'-О-метил уридин. и s означает фосфоротиоатную связь, и где агент DUX4 РНКи дополнительно включает смысловую цепь, которая по меньшей мере частично является комплементарной антисмысловой цепи, и где все или практически все нуклеотиды смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте, включает антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из модифицированных нуклеотидных последовательностей или включает нуклеотидные последовательности, которые отличаются на 0 или 1 нуклеотид от одной из следующих нуклеотидных последовательностей (5' → 3'):

usAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:82),

cPrpusAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:84),
 cPrpusAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:100),
 cPrpusAfsGfsaauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:101),
 cPrpusGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:97),
 5 cPrpusGfsasAfaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:99),
 cPrpusGfsasAfaCfcAfgAfuCfuGfaAfuCfcUfsg (SEQ ID NO:75),
 usGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:96),
 cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsu (SEQ ID NO:76),
 cPrpusUfsgsaaccagaUfcUfgAfauccsc (SEQ ID NO:89),
 10 cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsc (SEQ ID NO:87) и

где а, с, g, и u представляют собой 2'-О-метил аденозин, цитидин, гуанозин и уридин, соответственно, Af, Cf, Gf и Uf означают 2'-фтор аденозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно, cPrpu означает 5'-циклопропил фосфонат-2'-О-метил уридин. и s означает фосфоротиоатную связь, и где агент DUX4 РНКи
 15 дополнительно включает смысловую цепь, которая по меньшей мере частично является комплементарной антисмысловой цепи, и где все или практически все нуклеотиды смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, и где смысловая цепь дополнительно включает инвертированные остатки, лишенные азотистого основания, на 3'-конце нуклеотидной последовательности
 20 и на 5'-конце нуклеотидной последовательности, и смысловая цепь также включает направляющий лиганд, который ковалентно присоединен к инвертированному лишенному нуклеотидного основания остатку на 5'-конце, где направляющий лиганд характеризуется сродством к клеткам скелетных мышц и/или рецептору, присутствующему на клетках скелетных мышц, и где
 25 смысловая цепь также включает модулятор ФК/ФД, который ковалентно присоединен к инвертированному остатку, лишенному азотистого основания на 3'-конце.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте, включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, которая состоит, в основном
 30 состоит или включает модифицированные нуклеотидные последовательности, которые отличаются на 0 или 1 нуклеотид от одной из следующих пар нуклеотидных последовательностей (5' → 3'):

usAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:82) и
 cuguucuuCfCfGfugaaauucua (SEQ ID NO:149),

- cPrpusAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:84) и
 cuguucuuCfCfGfugaaaauucua (SEQ ID NO:149),
 cPrpusAfsgsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:100) и
 cuguucuuCfCfGfugaaaauucua (SEQ ID NO:149),
 5 cPrpusAfsGfsaauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:101) и
 cuguucuuCfCfGfugaaaauucua (SEQ ID NO:149), или
 cPrpusGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:97) и
 caggauucAfGfAfucugguuua (SEQ ID NO:147),
 cPrpusGfsasAfacagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:99) и
 10 caggauucAfGfAfucugguuua (SEQ ID NO:147),
 cPrpusGfsasAfaCfcAfgAfuCfuGfaAfuCfcUfsg (SEQ ID NO:75) и
 caggauucAfGfAfucugguuua (SEQ ID NO:147),
 usGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:96) и
 caggauucAfGfAfucugguuua (SEQ ID NO:147).
 15 cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsu (SEQ ID NO:76) и
 aggauucaGfAfUfcugguuuaa (SEQ ID NO:148),
 cPrpusUfsgsaaaccagaUfcUfgAfauccsc (SEQ ID NO:89) и
 gggauucaGfAfUfcugguuuaa (SEQ ID NO:156),
 cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsc (SEQ ID NO:87) и
 20 gggauucaGfaUfCfugguuuaa (SEQ ID NO:159),

где а, с, g, и и представляют собой 2'-О-метил аденозин, цитидин, гуанозин и уридин, соответственно, Af, Cf, Gf и Uf означают 2'-фтор аденозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно, сPrpu означает 5'-циклопропил фосфонат-2'-О-метил уридин. и s означает фосфоротиоатную связь.

- 25 В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте, включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, которая состоит, в основном состоит или включает следующие модифицированные нуклеотидные последовательности, (5' → 3'):

- usAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:82) и
 30 cuguucuuCfCfGfugaaaauucua (SEQ ID NO:149),
 cPrpusAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:84) и
 cuguucuuCfCfGfugaaaauucua (SEQ ID NO:149),
 cPrpusAfsgsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:100) и
 cuguucuuCfCfGfugaaaauucua (SEQ ID NO:149),

cPrpusAfsGfsaauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:101) и
 cuguucuuCfCfGfugaaaucua (SEQ ID NO:149), или
 cPrpusGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:97) и
 caggauucAfGfAfucugguuuca (SEQ ID NO:147),
 5 cPrpusGfsasAfaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:99) и
 caggauucAfGfAfucugguuuca (SEQ ID NO:147),
 cPrpusGfsasAfaCfcAfgAfuCfuGfaAfuCfcUfsg (SEQ ID NO:75) и
 caggauucAfGfAfucugguuuca (SEQ ID NO:147),
 usGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:96) и
 10 caggauucAfGfAfucugguuuca (SEQ ID NO:147),
 cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsu (SEQ ID NO:76) и
 aggauucaGfAfUfcugguuucaa (SEQ ID NO:148),
 cPrpusUfsgsaaaccagaUfcUfgAfauccsc (SEQ ID NO:89) и
 gggauucaGfAfUfcugguuucaa (SEQ ID NO:156),
 15 cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsc (SEQ ID NO:87) и
 gggauucaGfaUfCfugguuucaa (SEQ ID NO:159),

где а, с, g, и u представляют собой 2'-О-метил аденозин, цитидин, гуанозин
 и уридин, соответственно, Af, Cf, Gf и Uf означают 2'-фтор аденозин, цитидин,
 гуанозин и уридин соответственно, cPrpu означает 5'-циклопропил фосфонат-2'-
 20 О-метил уридин. и s означает фосфоротиоатную связь, и где смысловая цепь
 также включает инвертированный лишенный нуклеотидного основания остаток
 на 3'-конце нуклеотидной последовательности и на 5'-конце нуклеотидной
 последовательности, и смысловая цепь также включает направляющий лиганд,
 который ковалентно присоединен к инвертированному остатку, лишенному
 25 азотистого основания на 5'-конце, где направляющий лиганд характеризуется
 сродством к клеткам скелетных мышц и/или рецептору, присутствующему на
 клетках скелетных мышц, и где смысловая цепь также включает модулятор
 ФК/ФД, который ковалентно присоединен к инвертированному остатку,
 лишенному азотистого, на 3'-конце.

30 В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте,
 включает антисмысловую цепь, которая включает нуклеотидную
 последовательность, которая отличается на 0 или 1 нуклеотид от следующих пар
 нуклеотидных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из одной
 из следующих последовательностей (5' → 3'):

UAGAAUUUCACGGAAGAAC (SEQ ID NO:22)

UGAAACCAGAUUCUGAAUCC (SEQ ID NO:10) и

UUGAAACCAGAUUCUGAAUC (SEQ ID NO:14);

где все или практически все нуклеотиды являются модифицированными

5 нуклеотидами.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте, включает антисмысловую цепь, которая отличается на 0 или 1 нуклеотид от следующих нуклеотидных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из следующих последовательностей (5' → 3'):

10 UAGAAUUUCACGGAAGAAC (SEQ ID NO:22),

UGAAACCAGAUUCUGAAUCC (SEQ ID NO:10) и

UUGAAACCAGAUUCUGAAUC (SEQ ID NO:14),

где все или практически все нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами, и где соответствующая последовательность находится в

15 положениях нуклеотидов 1-19 (5' → 3') антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте, включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, которая включает нуклеотидную последовательность, каждая из которых включает нуклеотидные последовательности, которые отличаются на 0 или 1 нуклеотид от следующих пар нуклеотидных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из

20 UAGAAUUUCACGGAAGAAC (SEQ ID NO:22) и

GUUCUCCGUGAAAUUCUA (SEQ ID NO:50),

UGAAACCAGAUUCUGAAUCC (SEQ ID NO:10) и

25 GGAUUCAGAUUCUGGUUUCA (SEQ ID NO:38) и

UUGAAACCAGAUUCUGAAUC (SEQ ID NO:14) и

GAUUCAGAUUCUGGUUUCAA (SEQ ID NO:42), и

где все или практически все нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами.

30 Используемые в данном контексте термины «олигонуклеотид» и «полинуклеотид» означают полимер из присоединенных друг к другу нуклеозидов, каждый из которых может являться независимо модифицированным или немодифицированным.

Используемый в данном контексте термин «агент РНКи» (также называемый «триггер РНКи») означает композицию, содержащую РНК или РНК-подобную (например, химически модифицированную РНК) олигонуклеотидную молекулу, которая способна нарушать или ингибировать (например, нарушает или ингибирует в соответствующих условиях) трансляцию транскриптов матричной РНК (мРНК) мРНК-мишени специфичным в отношении последовательности образом. Используемые в данном контексте агенты РНКи могут действовать по механизму РНК-интерференции (т. е. индуцируя РНК-интерференцию при участии в метаболическом каскаде реакций РНК-интерференции (РНК-индуцированный комплекс сайленсинга или RISC) клеток млекопитающих) или при участии по любому альтернативному(ым) механизму(ам) или в каскаде(ах) реакций. Хотя считается, что агенты РНКи, как этот термин используется в данном контексте, действуют главным образом по механизму РНК-интерференции, при этом описанные в данном контексте агенты РНКи не связаны и не ограничены каким-либо конкретным метаболическим каскадом реакций или механизмом действия. Агенты РНКи, используемые в данном контексте, состоят из смысловой цепи и антисмысловой цепи и включают, но не ограничиваясь только ими: короткие (или малые) интерферирующие РНК (siRNA), двухцепочечные РНК (dsRNA), микроРНК (miRNA), короткую шпилечную РНК (shRNA) и субстраты фермента-дайсера. Антисмысловая цепь агентов РНКи, используемых в данном контексте, является по меньшей мере частично комплементарной мРНК-мишени (то есть DUX4 мРНК). Агенты РНКи могут включать один или более модифицированных нуклеотидов и/или одну или более нефосфодиэфирных связей.

Используемые в данном контексте термины «сайленс», «уменьшать», «ингибировать», «подавлять» или «нокаут» при ссылке на экспрессию данного гена означают, что экспрессия гена, измеренная по содержанию РНК, транскрибируемой с гена, или по содержанию полипептида, белка или белковой субъединицы, транслируемых с мРНК, в клетке, группе клеток, ткани, органе или у субъекта, у которых транскрибируется ген, снижается, когда на клетку, группу клеток, ткань, орган или субъекта воздействуют агентами РНКи, описанными в данном контексте, по сравнению со второй клеткой, группой клеток, тканью, органом или субъектом, которые не подвергаются или не подвергались такому воздействию.

Используемые в данном контексте термины «последовательность» и «нуклеотидная последовательность» означают последовательность или порядок расположения азотистых оснований или нуклеотидов, описанных последовательностью букв с использованием стандартной номенклатуры.

Используемые в данном контексте термины «основание», «нуклеотидное основание» или «азотистое основание» представляют собой гетероциклическое пиримидиновое или пуриновое соединение, которое является компонентом нуклеотида и включает первичные пуриновые основания аденин и гуанин, а также первичные пиримидиновые основания цитозин, тимин и урацил.

Азотистое основание может являться дополнительно модифицированным для включения, но без ограничения перечисленным, универсальных оснований, гидрофобных оснований, «неразборчивых» оснований, увеличенных в размере оснований и фторированных оснований (см., например, справочник *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, под ред. Herdewijn, P. Wiley-VCH, 2008). Синтез таких модифицированных азотистых оснований (включая фосфоамидитные соединения, которые включают модифицированные нуклеотидные основания) известен в данной области техники.

Использованный в данном контексте термин «нуклеотид» имеет значение, хорошо известное специалистам в данной области техники, и таким образом означает гликозид, включающий сахаридный фрагмент, фрагмент основания и ковалентно присоединенную группу (связующую группу), такую как фосфатная или фосфоротриатная межнуклеотидная связующая группа, и включает как природные нуклеотиды, такие как ДНК или РНК, так и неприродные нуклеотиды, включающие модифицированные сахаридные фрагменты и/или фрагменты модифицированных оснований, которые в данном контексте могут быть также названы аналогами нуклеотидов или модифицированными нуклеотидами. В данном контексте один нуклеотид может быть назван мономером или звеном.

Используемый в данном контексте термин «комплементарный», если не указано иное, при использовании для описания первой последовательности азотистых оснований или нуклеотидов (например, смысловой цепи агента РНКи или мРНК-мишени) по отношению ко второй последовательности азотистых оснований или нуклеотидов (например, антисмысловая цепь агента РНКи или

одноцепочечный антисмысловой олигонуклеотид), означает способность олигонуклеотида или полинуклеотида, включающего первую нуклеотидную последовательность, к гибридизации (образовать водородные связи пар оснований в физиологических условиях млекопитающих (или в других пригодных условиях *in vivo* или *in vitro*)) и к образованию дуплексной или двойной спиральной структуры при определенных стандартных условиях, с олигонуклеотидом, включающим вторую нуклеотидную последовательность. Специалист в данной области техники может выбрать набор условий, которые в наибольшей степени являются пригодными для теста гибридизации.

- 10 Комплементарные последовательности включают пары оснований Уотсона-Крика или пары оснований, отличающиеся от пар Уотсона-Крика, и включают природные или модифицированные нуклеотиды или миметики нуклеотидов, по меньшей мере, в той степени, в которой выполняются вышеуказанные требования для гибридизации. Идентичность или комплементарность
- 15 последовательностей не зависят от модификации. Например, а и Af, как определено в данном контексте, комплементарны U (или T) и идентичны A согласно определению идентичности или комплементарности.

- Используемый в данном контексте термин «абсолютно комплементарный» или «полностью комплементарный» означает, что в гибридизованной паре
- 20 последовательностей азотистых оснований или нуклеотидов все (100%) основания в непрерывной последовательности первого олигонуклеотида будут гибридизоваться с одним и тем же количеством оснований в непрерывной последовательности второго олигонуклеотида. Непрерывная последовательность может включать всю или часть первой или второй нуклеотидной
- 25 последовательности.

- Используемый в данном контексте термин «частично комплементарный» означает, что в гибридизованной паре последовательностей азотистых оснований или нуклеотидов по меньшей мере 70%, но не все, оснований в непрерывной последовательности первого олигонуклеотида будут
- 30 гибридизоваться с одинаковым числом оснований в непрерывной последовательности второго олигонуклеотида. Непрерывная последовательность может включать всю или часть первой или второй нуклеотидной последовательности.

Используемые в данном контексте термины «комплементарный», «полностью комплементарный», «частично комплементарный» и «в основном комплементарный» используются в отношении совпадения азотистых оснований или нуклеотидов в смысловой цепи и антисмысловой цепи агента РНКи или в антисмысловой цепи агента РНКи и последовательности DUX4 мРНК.

Используемый в данном контексте термин «в основном идентичный» или «практически идентичный» применительно к последовательности нуклеиновой кислоты означает, что последовательность нуклеотидов (или часть последовательности нуклеотидов) включает по меньшей мере приблизительно 85% идентичной последовательности или более, например, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичных последовательностей по сравнению с эталонной последовательностью.

Идентичность последовательностей в % определяют при сравнении двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения. Процент рассчитывается при определении количества положений, в которых один и тот же тип основания нуклеиновой кислоты присутствует в обеих последовательностях, чтобы рассчитать количество совпадающих положений, при делении количества совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения результата на 100, чтобы получить идентичность последовательности в %. Используемые в данном контексте изобретения последовательности охватывают нуклеотидные последовательности, в основном идентичные раскрытым в данном контексте.

Используемые в данном контексте термины «индивидуум», «пациент» и «субъект» использованы взаимозаменяемо для обозначения представителей любых видов животных, включая, но не ограничиваясь только перечисленным, птиц, человека и других нечеловекообразных приматов и других млекопитающих, включая коммерчески значимые млекопитающие или модели животных, такие как мыши, крысы, обезьяны, крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, кошки и собаки. Предпочтительно субъектом является человек.

Используемые в данном контексте термины «лечить», «лечение» и т.п. означают способы или меры, предпринимаемые для облегчения или уменьшения числа, тяжести и/или частоты одного или более симптомов заболевания у субъекта. Используемые в данном контексте термины «лечить» и «лечение» могут включать профилактику, терапию, профилактическое лечение или

вмешательство и/или замедление или уменьшение числа, тяжести и/или частоты одного или более симптомов заболевания у субъекта.

Использованный в данном контексте термин «введение в клетку» применительно к агенту РНКи означает функциональную доставку агента РНКи в клетку. Термин «функциональная доставка» означает доставку агента РНКи в клетку таким способом, который обеспечивает ожидаемую биологическую активность агента РНКи, например, специфичное к последовательности ингибирование экспрессии гена.

Если не указано иное, использованный в данном контексте символ  означает, что любая группа или группы могут быть присоединены к структуре, что соответствует области настоящего изобретения.

Используемый в данном контексте термин «изомеры» относится к соединениям, которые характеризуются идентичными молекулярными формулами, но различаются по природе или последовательности связывания их атомов или по расположению их атомов в пространстве. Изомеры, различающиеся расположением атомов в пространстве, называются «стереоизомерами». Стереоизомеры, которые не являются зеркальными отображениями друг друга, называются «диастереоизомерами», а стереоизомеры, которые не представляют собой наложенные друг на друга зеркальные отображения, называются «энантиомерами» или иногда оптическими изомерами. Атом углерода, связанный с четырьмя неидентичными заместителями, называется «хиральным центром».

В данном контексте, если специально не указано для структуры с конкретной конформацией, для каждой структуры, в которой присутствуют асимметричные центры и, таким образом, образуются энантиомеры, диастереомеры или другие стереоизомерные конфигурации, каждая структура, использованная в данном контексте, предназначена для представления всех таких возможных изомеров, включая их оптически чистые и рацемические формы. Например, используемые в данном контексте структуры, как предполагается, охватывают смеси диастереомеров, а также отдельных стереоизомеров.

Используемый в формуле настоящего изобретения термин «состоящий из» исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанные в формуле

изобретения. При использовании в формуле изобретения в данном контексте термин «в основном состоящий из» ограничивает объем формулы изобретения конкретными материалами или стадиями, а также теми, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики заявленного изобретения.

5 Специалисту в данной области техники представляется очевидным, что соединения и композиции, раскрытые в данном контексте, могут включать определенные атомы (например, атомы N, O или S) в протонированном или депротонированном состоянии, в зависимости от условий окружающей среды, в которую присутствует соединение или композиция. Соответственно, для
10 используемых в данном контексте структур, раскрытых в настоящем изобретении, предусмотрено, что определенные функциональные группы, такие как, например, OH, SH или NH, могут являться протонированными или депротонированными. Настоящее изобретение в данном контексте охватывает соединения и композиции независимо от их протонированного состояния в
15 соответствии с условиями окружающей среды (такими как pH), что должно представляться очевидным специалисту в данной области техники. Соответственно, описанные в данном контексте соединения могут находиться в форме свободной кислоты, свободного основания или соли. Следует понимать, что фармацевтически приемлемые соли описанных в данном контексте
20 соединений включены в объем настоящего изобретения. Типичная фармацевтически приемлемая соль описанных агентов DUX4 РНКи находится в форме натриевой соли.

Используемый в данном контексте термин «присоединенный» или «конъюгированный» применительно к соединению двух соединений или
25 молекул означает, что две молекулы или два соединения или две молекулы соединены ковалентной связью. Если не указано иное, термины «присоединенный» и «конъюгированный», используемые в данном контексте, могут относиться к связи между первым соединением и вторым соединением как с промежуточными атомами или группами атомов, так и без них.

30 Используемый в данном контексте термин «включает», использованный в данном контексте, используется взаимозаменяемо с термином «включая, но не ограничиваясь только этим». Термин «или», используемый в данном контексте, используется взаимозаменяемо с термином «и/или», если в контексте явно не указано иное.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном контексте, имеют то же значение, которое обычно представляется очевидным специалистам в данной области техники. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном контексте, могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения, пригодные способы и материалы описаны ниже. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном контексте, в полном объеме включены в настоящее изобретение в качестве ссылок. В случае возникновения конфликта интересов, настоящее описание изобретения, включая определения, принятые в данной области техники, будут иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры носят исключительно иллюстративный характер и не ограничивают объем изобретения.

Если значение указано явно, следует понимать, что значения, которые приблизительно равны количеству или сумме, что и указанное значение, также включены в объем раскрытия. Если раскрывается комбинация, каждая подкомбинация элементов этой комбинации также конкретно раскрывается и включена в объем изобретения. И наоборот, когда различные элементы или группы элементов раскрываются по отдельности, также раскрываются их комбинации. Если какой-либо элемент описания раскрывается как имеющий множество вариантов осуществления, настоящим также раскрываются примеры этого раскрытия, в которых каждый вариант исключен отдельно или в любой комбинации с другими вариантами; и более чем один элемент раскрытия может иметь такие исключения, и настоящим раскрываются все комбинации элементов, имеющих такие исключения.

Другие цели, признаки, объекты и преимущества изобретения будут представляться очевидными из следующего подробного описания, сопроводительных фигур и формулы изобретения.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлены средние массы тела FSHD-подобных моделей мышей, как более подробно описано в примере 3.

На фиг. 2 представлены средние массы тела FSHD-подобных моделей мышей, как более подробно описано в примере 4.

На фиг. 3 представлены средние массы тела FSHD-подобных моделей мышей, как более подробно описано в примере 4.

На фиг. 4 представлены средние массы тела FSHD-подобных моделей мышей, как более подробно описано в примере 5.

5 На фиг. 5 представлены средние массы тела FSHD-подобных моделей мышей, как более подробно описано в примере 6.

На фиг. 6 представлены средние массы тела FSHD-подобных моделей мышей, как более подробно описано в примере 6.

10 На фиг. 7 представлены средние массы тела FSHD-подобных моделей мышей, как более подробно описано в примере 7.

На фиг. 8 представлено время на приборе Rotarod для FSHD-подобных моделей мышей, как более подробно описано в примере 7.

На фиг. 9 представлены средние массы тела FSHD-подобных моделей мышей, как более подробно описано в примере 8.

15 На фиг. 10 представлены средние массы тела FSHD-подобных моделей мышей, как более подробно описано в примере 9.

На фиг. 11 представлены средние массы тела FSHD-подобных моделей мышей, как более подробно описано в примере 10.

20 На фиг. 12 представлено время на приборе Rotarod для FSHD-подобных моделей мышей, как более подробно описано в примере 10.

На фиг. 13 представлен график экспрессии *DUX4* в полученных от пациента мышечных трубочках, как более подробно описано в примере 11.

25 На фиг. 14 представлен график относительной экспрессии нескольких биомаркерных генов, которые, как известно, связаны с FSHD в мышечных трубочках у пациентов с FSHD, как более подробно описано в примере 11.

30 На фиг. 15A представлена схема модифицированных смысловой и антисмысловой цепей конъюгата агента DUX4 РНКи, который характеризуется структурой AC000232 (см. например, табл. 5.4), включающей направляющий лиганд avb6-SM45b, присоединенный через линкер L4 к связующей группе (NH₂-C₆) на 5' конце смысловой цепи, и включающий ФК/ФД модулятор, характеризующийся структурой LP1b, присоединенной через C6-SS-C6 линкер на 3' конце (см., например, примеры 1 и 3, представленные в данном контексте).

Использованные на фиг. 15A-15I сокращения: а, с, g, и u представляют собой 2'-О-метил модифицированные нуклеотиды, Af, Cf, Gf и Uf означают 2'-

фтор модифицированные нуклеотиды, o означает фосфодиэфирную связь, s означает фосфоротиоатную связь, cPgru означает 5'-циклопропил фосфонат-2'-О-метил уридин, инвAb означает инвертированный остаток, лишенный азотистого основания (см., например табл. 6.1); cPgru означает модифицированный нуклеотид, 5'-циклопропил-2'-О-метилуридин (см., например, табл. 6.1); avb6-SM45b означает низкомолекулярный направляющий лиганд SM45b (см., например, табл. 6.3); -L4- означает линкер, характеризующийся структурой, описанной в примере 3; avb6-per1 означает avb6 пептид 1 направляющий лиганд (см., например, табл. 6.3); -C6-S- означает связующую группу, как показано в табл. 6.1; (NH-C6) означает связующую группу, как показано в табл. 6.1; и LP1b, LP29b и LP38b, каждый из которых соответственно является модулятором ФК/ФД, которые характеризуются структурой, как показано в табл. 6,7 (см. также примеры 1 и 3 в данном контексте).

На фиг. 15Б представлена схема модифицированных смысловой и антисмысловой цепей конъюгата агента DUX4 РНКи, который характеризуется структурой AC000247 (см. например, табл. 5.4), включающей направляющий лиганд avb6-пептид 1, присоединенный к связующей группе (NH₂-C₆) на 5' конце смысловой цепи, и включающий ФК/ФД модулятор, характеризующийся структурой LP38b, присоединенной к линкеру C6-SS-C6 на 3' конце смысловой цепи (см., например, примеры 1 и 3, представленные в данном контексте).

На фиг. 15В представлена схема модифицированных смысловой и антисмысловой цепей конъюгата агента DUX4 РНКи, который характеризуется структурой AC000278 (см. например, табл. 5.4), включающей направляющий лиганд avb6-SM45b, присоединенный через линкер L4 к связующей группе (NH₂-C₆) на 5' конце смысловой цепи, и включающий ФК/ФД модулятор, характеризующийся структурой LP1b, присоединенной через линкер C6-SS-C6 на 3' конце смысловой цепи (см., например, примеры 1 и 3, представленные в данном контексте).

На фиг. 15Г представлена схема модифицированных смысловой и антисмысловой цепей конъюгата агента DUX4 РНКи, который характеризуется структурой AC000280 (см. например, табл. 5.4), включающей направляющий лиганд avb6-SM45b, присоединенный через линкер L4 к связующей группе (NH₂-C₆) на 5' конце смысловой цепи, и включающий ФК/ФД модулятор,

характеризующийся структурой LP1b, присоединенной через линкер C6-SS-C6 на 3' конце смысловой цепи (см., например, примеры 1 и 3, представленные в данном контексте).

На фиг. 15Д представлена схема модифицированных смысловой и антисмысловой цепей конъюгата агента DUX4 РНКи, который характеризуется структурой AC000281 (см. например, табл. 5.4), включающей направляющий лиганд avb6-SM45b, присоединенный через линкер L4 к связующей группе (NH₂-C₆) на 5' конце смысловой цепи, и включающий ФК/ФД модулятор, характеризующийся структурой LP1b, присоединенной через линкер C6-SS-C6 на 3' конце смысловой цепи (см., например, примеры 1 и 3, представленные в данном контексте).

На фиг. 15Е представлена схема модифицированных смысловой и антисмысловой цепей конъюгата агента DUX4 РНКи, который характеризуется структурой AC000446 (см. например, табл. 5.4), включающей направляющий лиганд avb6-пептид 1, присоединенный к связующей группе (NH₂-C₆) на 5' конце смысловой цепи, и включающий ФК/ФД модулятор, характеризующийся структурой LP29b, присоединенной через линкер C6-SS-C6 на 3' конце смысловой цепи (см., например, примеры 1 и 3, представленные в данном контексте).

На фиг. 15Ж представлена схема модифицированных смысловой и антисмысловой цепей конъюгата агента DUX4 РНКи, который характеризуется структурой AC000447 (см. например, табл. 5.4), включающей направляющий лиганд avb6-пептид 1, присоединенный к связующей группе (NH₂-C₆) на 5' конце смысловой цепи, и включающий ФК/ФД модулятор, характеризующийся структурой LP29b, присоединенной через линкер C6-SS-C6 на 3' конце смысловой цепи (см., например, примеры 1 и 3, представленные в данном контексте).

На фиг. 15З представлена схема модифицированных смысловой и антисмысловой цепей конъюгата агента DUX4 РНКи, который характеризуется структурой AC000448 (см. например, табл. 5.4), включающей направляющий лиганд avb6-пептид 1, присоединенный к связующей группе (NH₂-C₆) на 5' конце смысловой цепи, и включающий ФК/ФД модулятор, характеризующийся структурой LP29b, присоединенной через линкер C6-SS-C6 на 3' конце

смысловой цепи (см., например, примеры 1 и 3, представленные в данном контексте).

На фиг. 15И представлена схема модифицированных смысловой и антисмысловой цепей конъюгата агента DUX4 РНКи, который характеризуется структурой AC000449 (см. например, табл. 5.4), включающей направляющий лиганд avb6-пептид 1, присоединенный к связующей группе ($\text{NH}_2\text{-C}_6$) на 5' конце смысловой цепи, и включающий ФК/ФД модулятор, характеризующийся структурой LP28b, присоединенной через линкер C6-SS-C6 на 3' конце смысловой цепи (см., например, примеры 1 и 3, представленные в данном контексте).

На фиг. 16А – 16Д представлена химическая структура конъюгата агента DUX4 РНКи AC000446 (см. например, табл. 5.4), в форме свободной кислоты.

На фиг. 17А – 17Д представлена химическая структура конъюгата агента DUX4 РНКи AC000446 (см. например, табл. 5.4), в форме натриевой соли.

На фиг. 18А – 18Д представлена химическая структура конъюгата агента DUX4 РНКи AC000448 (см. например, табл. 5.4), в форме свободной кислоты.

На фиг. 19А – 19Д представлена химическая структура конъюгата агента DUX4 РНКи AC000448 (см. например, табл. 5.4), в форме натриевой соли.

На фиг. 20А – 20Д представлена химическая структура конъюгата агента DUX4 РНКи AC000449 (см. например, табл. 5.4), в форме свободной кислоты.

На фиг. 21А – 21Д представлена химическая структура конъюгата агента DUX4 РНКи AC000449 (см. например, табл. 5.4), в форме натриевой соли.

Подробное описание настоящего изобретения

В данном изобретении предлагаются агенты РНКи для ингибирования экспрессии гена *DUX4* (называемые также агентами DUX4 РНКи или триггерами DUX4 РНКи). Каждый агент DUX4 РНКи включает смысловую цепь и антисмысловую цепь. Длина смысловой цепи может составлять от 15 до 49 нуклеотидов. Длина каждой антисмысловой цепи может составлять от 17 до 49 нуклеотидов. Смысловая и антисмысловая цепи могут характеризоваться как одинаковой, так и различной длиной. В некоторых вариантах смысловая и антисмысловая цепи каждая независимо характеризуется длиной от 17 до 27 нуклеотидов. В некоторых вариантах длина каждой смысловой и антисмысловой цепей независимо составляет от 19 до 21 нуклеотида. В некоторых вариантах длина как смысловой, так и антисмысловой цепи составляет 21-26 нуклеотидов.

В некоторых вариантах длина как смысловой, так и антисмысловой цепи составляет 21-24 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина смысловой цепи составляет приблизительно 19 нуклеотидов, в то время как длина антисмысловой цепи составляет приблизительно 21 нуклеотид. В некоторых вариантах длина смысловой цепи независимо составляет 21 нуклеотид, в то время как длина антисмысловой цепи составляет приблизительно 23 нуклеотида. В некоторых вариантах длина смысловой цепи составляет 23 нуклеотида, в то время как длина антисмысловой цепи составляет приблизительно 21 нуклеотид. В некоторых вариантах длина как смысловой, так и антисмысловой цепи составляет 21 нуклеотид. В некоторых вариантах длина смысловых цепей агента РНКи составляет 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 или 49 нуклеотидов. В некоторых вариантах длина антисмысловых цепей агента РНКи составляет 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов, В некоторых вариантах агент двухцепочечной РНКи включает дуплекс, длина которого составляет приблизительно 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотида.

Примеры нуклеотидных последовательностей, использованных при формировании агентов DUX4 РНКи представлены в таблицах 2, 3, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 и 5.4. Примеры дуплексов агентов РНКи, перечисленных в табл. 2, 3, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, указаны в табл. 5.1, 5.2, 5.3 и 5.4.

В некоторых вариантах область полной, значительной или частичной комплементарности между смысловой цепью и антисмысловой цепью (иногда называемая “дуплексной областью”) находится в положениях 12-26 (например, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26) нуклеотидов, и расположена на 5' конце антисмысловой цепи или вблизи от него (например, эта область может быть отделена от 5' конца антисмысловой цепи 0, 1, 2, 3 или 4 нуклеотидами, которые не характеризуются полной, значительной или частичной комплементарностью).

Смысловая цепь агентов DUX4 РНКи, описанных в данном контексте, включает по меньшей мере 12 последовательных нуклеотидов, которые идентичны по меньшей мере на 85% по сравнению с последовательностью корового тяжа (называемого также «коровым участком» или «коровой последовательностью»), включающей такое же количество нуклеотидов в мРНК

DUX4. В некоторых вариантах последовательность корового тяжа смысловой цепи на 100% (полностью) комплементарна или по меньшей мере приблизительно на 85% (значительно) комплементарна последовательности корового тяжа в антисмысловой цепи, и, таким образом, последовательность корового тяжа смысловой нити обычно полностью идентична или по меньшей мере приблизительно на 85% идентична нуклеотидной последовательности такой же длины (иногда называемой, например, последовательностью-мишенью), присутствующей в DUX4 мРНК-мишени. В некоторых вариантах длина такого корового тяжа смысловой цепи составляет 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида. В некоторых вариантах длина такого корового тяжа смысловой цепи составляет 19 нуклеотидов. В некоторых вариантах длина такого корового тяжа смысловой цепи составляет 21 нуклеотид.

Антисмысловая цепь агента DUX4 РНКи, описанного в данном контексте, включает по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, которые комплементарны по меньшей мере на 85% по сравнению с последовательностью корового тяжа, включающей такое же количество нуклеотидов в DUX4 мРНК, и в некоторых вариантах по сравнению с последовательностью корового тяжа, включающей такое же количество нуклеотидов в соответствующей смысловой цепи. В некоторых вариантах последовательность корового тяжа антисмысловой цепи на 100% (полностью) комплементарна или по меньшей мере приблизительно на 85% (значительно) комплементарна нуклеотидной последовательности корового тяжа, (например, последовательности-мишени) такой же длины, присутствующей в DUX4 мРНК-мишени. В некоторых вариантах длина такого корового тяжа антисмысловой цепи составляет 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида. В некоторых вариантах длина такого корового тяжа антисмысловой цепи составляет 19 нуклеотидов. В некоторых вариантах длина такого корового тяжа антисмысловой цепи составляет 17 нуклеотидов. В некоторых вариантах длина такого корового тяжа антисмысловой цепи составляет 21 нуклеотид. В некоторых вариантах длина такого корового тяжа антисмысловой цепи составляет 23 нуклеотид. Последовательность корового тяжа смысловой цепи может характеризоваться одинаковой длиной или различной длиной по сравнению с соответствующей последовательностью антисмысловой цепи.

Смысловую и антисмысловую цепи агента DUX4 РНКи отжигают, при этом получают дуплекс. Смысловая и антисмысловая цепи агента DUX4 РНКи могут являться частично, значительно или полностью комплементарными друг с другом. В области комплементарного дуплекса, последовательность корового

5 тяжа смысловой цепи по меньшей мере на 85% комплементарна или на 100% комплементарна последовательности корового тяжа антисмысловой цепи. В некоторых вариантах последовательность корового тяжа смысловой цепи содержит последовательность по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по

10 меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, или по меньшей мере 23 нуклеотида, которые комплементарны по меньшей мере на 85% или 100% по сравнению с соответствующими нуклеотидной последовательностью из 16, 17, 18, 19, 20, 21,

15 22 или 23 нуклеотидов коровой последовательности антисмысловой цепи (то есть последовательности коровых тяжей смысловой цепи и антисмысловой цепей агента DUX4 РНКи содержат область из по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по

20 меньшей мере 21, по меньшей мере 22, или по меньшей мере 23 нуклеотидов, в которых по меньшей мере 85% оснований являются спаренными или 100% оснований являются спаренными).

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой последовательности антисмысловой цепи, представленной в табл. 2, табл. 3 или табл. 5.4.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой последовательности смысловой

25 цепи, представленной в табл. 2 или табл. 4.1, или табл. 4.2, или табл. 4.3 или табл. 4.4, или табл. 4.5, табл. 4.6, или табл. 5.4.

В некоторых вариантах смысловая цепь и/или антисмысловая цепь может необязательно или независимо содержать дополнительные 2, 3, 4, 5 или 6

30 нуклеотидов (удлинение) на 3' конце, на 5' конце, или на обоих 3' и 5' концах последовательностей коровых тяжей. Дополнительные нуклеотиды антисмысловой цепи, если присутствуют, могут являться или не являться комплементарными с соответствующей последовательностью DUX4 мРНК. Дополнительные нуклеотиды смысловой цепи, если присутствуют, могут являться или не являться идентичными соответствующей последовательности

DUX4 мРНК. Дополнительные нуклеотиды антисмысловой цепи, если присутствуют, могут являться или не являться комплементарными с соответствующей последовательностью дополнительных нуклеотидов смысловой цепи, если они присутствуют.

5 Как указано в данном контексте, удлинение включает 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов на 5' конце и/или на 3' конце коровой последовательности смысловой цепи и/или коровой последовательности антисмысловой цепи. Удлинение нуклеотидов на смысловой цепи может являться или не являться комплементарным нуклеотидам, либо последовательности нуклеотидов корового

10 тяжа, либо нуклеотидам удлинения в соответствующей антисмысловой цепи. И наоборот, удлинение нуклеотидов в антисмысловой цепи может являться или не являться комплементарным нуклеотидам, либо последовательности нуклеотидов корового тяжа, либо нуклеотидам удлинения в соответствующей смысловой цепи. В некоторых вариантах обе цепи смысловая и антисмысловая агента РНКи

15 содержат 3' и 5' удлинения. В некоторых вариантах один или более нуклеотидов 3' удлинения одной цепи оснований является спаренным с одним или более нуклеотидов 5' удлинения другой цепи. В других вариантах один или более нуклеотидов 3' удлинения одной цепи оснований не является спаренным с одним или более нуклеотидов 5' удлинения другой цепи. В некоторых вариантах агент

20 DUX4 РНКи содержит антисмысловую цепь, которая включает 3' удлинение, и смысловую цепь, которая включает 5' удлинение. В некоторых вариантах нуклеотид (нуклеотиды) являются неспаренными или образуют липкий конец. Как использовано в данном контексте, «липкий конец» означает тяж одного или более неспаренных нуклеотидов, расположенных на концевом фрагменте либо

25 смысловой цепи, либо антисмысловой цепи, который не образует участок гибридизированной или дуплексной части агента РНКи, описанного в данном контексте.

 В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи включает антисмысловую цепь, включающую 3' удлинение из 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. В других вариантах

30 агент DUX4 РНКи включает антисмысловую цепь, включающую 3' удлинение из 1, 2 или 3 нуклеотидов. В некоторых вариантах один или более нуклеотидов удлинения антисмысловой цепи включают нуклеотиды, комплементарные соответствующей последовательности DUX4 РНКи. В некоторых вариантах один или более нуклеотидов удлинения антисмысловой цепи включают нуклеотиды,

которые не являются комплементарными соответствующей последовательности DUX4 РНКи.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи включает смысловую цепь, включающую 3' удлинение из 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. В некоторых вариантах один или более нуклеотидов удлинения смысловой цепи включают аденозиновые, урациловые или тимидиновые нуклеотиды, динуклеотид АТ, или нуклеотиды, которые соответствуют или являются идентичными нуклеотидам в последовательности DUX4 мРНК. В некоторых вариантах 3' удлинение смысловой цепи включает или состоит из следующих последовательностей, но не ограничиваясь только ими: Т, УТ, ТТ, УУ, УУТ, ТТТ или ТТТТ (каждая указана с 5' конца к 3' концу).

Смысловая цепь может включать 3' удлинение и/или 5' удлинение. В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи включает смысловую цепь, включающую 5' удлинение из 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. В некоторых вариантах один или более нуклеотидов удлинения смысловой цепи включают нуклеотиды, которые соответствуют или являются идентичными нуклеотидам в последовательности DUX4 РНКи. В некоторых вариантах 5' удлинение смысловой цепи включает одну из следующих последовательностей, но не ограничиваясь только ими: СА, АУАГГС, АУАГГ, АУАГ, АУА, А, АА, АС, GCA, GGCA, GGC, UAUCA, UAUC, UCA, UAU, U, UU (каждая указана от 5' конца к 3' концу).

Примеры последовательностей, использованных при формировании агентов DUX4 РНКи, представлены в табл. 2, 3 и 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 и 5.4. В некоторых вариантах антисмысловая цепь агента DUX4 РНКи включает любую из последовательностей, представленных в табл. 2 или 3. В определенных вариантах антисмысловая цепь агента DUX4 РНКи включает или состоит из любой из модифицированных последовательностей, перечисленных в табл. 3 или табл. 5.4. В некоторых вариантах антисмысловая цепь агента DUX4 РНКи включает последовательность нуклеотидов (от 5' конца к 3' концу) 1-17, 2-15, 2-17, 1-18, 2-18, 1-19, 2-19, 1-20, 2-20, 1-21 или 2-21, любой из последовательностей, перечисленных в табл. 2, 3 или 5.4. В некоторых вариантах смысловая цепь агента DUX4 РНКи включает любую последовательность, перечисленную в табл. 2 или 4. В некоторых вариантах смысловая цепь агента DUX4 РНКи включает последовательность нуклеотидов

(от 5' конца к 3' концу) 1-18, 1-19, 1-20, 1-21, 2-19, 2-20, 2-21, 3-20, 3-21 или 4-21 любой из последовательностей, перечисленных в табл. 2, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 или 5.4. В некоторых вариантах смысловая цепь агента DUX4 РНКи включает или состоит из модифицированной последовательности, любой из модифицированных последовательностей, перечисленных в табл. 4.1, табл. 4.2, табл. 4.3, табл. 4.4, табл. 4.5, табл. 4.6 или табл. 5.4.

В некоторых вариантах смысловая и антисмысловая цепи агентов РНКи, описанных в данном контексте, содержат одно и то же количество нуклеотидов. В некоторых вариантах смысловая и антисмысловая цепи агентов РНКи, описанных в данном контексте, содержат различное количество нуклеотидов. В некоторых вариантах 5' конец смысловой цепи и 3' конец антисмысловой цепи агента РНКи образуют тупой конец. В некоторых вариантах 3' конец смысловой цепи и 5' конец антисмысловой цепи агента РНКи образуют тупой конец. В некоторых вариантах оба конца агента РНКи образуют тупой конец. В некоторых вариантах ни один из концов агента РНКи не образуют тупые концы. Используемый в данном контексте термин «тупой конец» означает конец двухцепочечного агента РНКи, в котором концевые нуклеотиды двух отождествленных цепей являются комплементарными (образуют комплементарную пару оснований).

В некоторых вариантах 5' конец смысловой цепи и 3' конец антисмысловой цепи агента РНКи образуют расщепленный конец. В некоторых вариантах 3' конец смысловой цепи и 5' конец антисмысловой цепи агента РНКи образуют расщепленный конец. В некоторых вариантах оба конца агента РНКи образуют расщепленный конец. В некоторых вариантах ни один из концов агента РНКи не образует расщепленный конец. Используемый в данном контексте термин «расщепленный конец» означает конец двуцепочечного агента РНКи, в котором концевые нуклеотиды двух отождествленных цепей образуют пару (то есть не образуют тяж), но не являются комплементарными (то есть образуют некомплементарную пару). В некоторых вариантах один или более неспаренных нуклеотидов на конце одной цепи двуцепочечного агента РНКи образует тяж. Неспаренные нуклеотиды могут располагаться на смысловой цепи или антисмысловой цепи, образуя либо 3' либо 5' тяжи. В некоторых вариантах агент РНКи содержит: тупой конец и расщепленный конец, тупой конец и 5' концевой тяж, тупой конец и 3' концевой тяж, расщепленный конец и 5' концевой тяж,

расщепленный конец и 3' концевой тяж, два 5' концевых тяжа, два 3' концевых тяжа, 5' концевой тяж и 3' концевой тяж, два расщепленных конца или два тупых конца. Обычно, если они присутствуют, тяжи расположены на 3' концах смысловой цепи, антисмысловой цепи или на обоих концах смысловой цепи и антисмысловой цепи.

Агенты DUX4 РНКи, описанные в данном контексте, могут также включать один или более модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах в основном все нуклеотиды смысловой цепи и в основном все нуклеотиды антисмысловой цепи агента DUX4 РНКи являются модифицированными нуклеотидами. Агенты DUX4 РНКи, описанные в данном контексте, могут дополнительно включать одну или более модифицированных межнуклеотидных связей, например, одну или более фосфоротиоатных или фосфородитиоатных связей. В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи содержит один или более модифицированных нуклеотидов и одну или более модифицированных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах 2' модифицированный нуклеотид присоединен через модифицированную межнуклеотидную связь.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи получают или представляют в виде соли, смешанной соли или свободной кислоты.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи получают в виде натриевой соли. В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи получают в виде натриевой соли. Такие соли известны в данной области техники в пределах объема настоящего изобретения, раскрытого в данном контексте.

Модифицированные нуклеотиды

Модифицированные нуклеотиды, при использовании в различных олигонуклеотидных конструктов, могут способствовать сохранению активности соединения в клетках и в то же время повышению стабильности этих соединений в сыворотке, и могут также свести к минимуму возможность активации активности интерферона у человека при введении конструкта олигонуклеотида.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи содержит один или более модифицированных нуклеотидов. Используемый в данном контексте термин «модифицированный нуклеотид» означает нуклеотид, отличающийся от рибонуклеотида (2'-гидроксинуклеотид). В некоторых вариантах по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%,

по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) нуклеотидов являются модифицированными нуклеотидами. Используемые в данном контексте модифицированные нуклеотиды могут включать, но не ограничиваясь только ими, дезоксирибонуклеотиды, миметики нуклеотидов, лишенные азотистого основания нуклеотиды, 2'-модифицированные нуклеотиды, инвертированные нуклеотиды, модифицированные содержащие азотистые основания нуклеотиды, мостиковые нуклеотиды, пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК), миметики 2',3'-секонуклеотида (незамкнутые аналоги азотистых оснований), замкнутые нуклеотиды, 3'-О-метокси (присоединенные через 2' межнуклеозидную связь) нуклеотиды, 2'-F-арабино нуклеотиды, 5'-метил, 2'-фтор нуклеотиды, морфолинонуклеотиды, винилфосфонат-содержащие нуклеотиды и циклопропилфосфонат-содержащие нуклеотиды, 2'-модифицированные нуклеотиды (то есть нуклеотид, содержащий группу, отличающуюся от гидроксильной группы в 2'-положении пятичленного сахаридного кольца), включают, но не ограничиваясь только ими, 2'-О-метил нуклеотиды (называемые также 2'-метоксинуклеотиды, 2'-фтор нуклеотиды), (называемые также 2'-дезоксидеокси-2'-фтореуклеотиды), 2'-дезоксидеокси нуклеотиды, 2'-метоксиэтил (2'-О-(2-метоксиэтил)) нуклеотиды (называемые также 2'-МОЕ), 2'-амино нуклеотиды и 2'-алкил нуклеотиды. Нет необходимости, чтобы все положения в данном соединении были модифицированы одинаково. И наоборот, более одной модификации можно включать в единый агент DUX4 РНКи или даже в единый его нуклеотид. Смысловые цепи и антисмысловые цепи агента DUX4 РНКи можно синтезировать и/или модифицировать известными в данной области техники способами. Модификация одного нуклеотида не зависит от модификации другого нуклеотида. Различные модифицированные нуклеотиды известны и описаны в данной области техники.

Модифицированные азотистые основания включают синтетические и природные азотистые основания, такие как 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6 замещенные пурины, (например, 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил или 5-пропинилцитозин), 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, инозин (гипоксантин), ксантин, 2-аминоаденин, 6-алкил (например, 6-метил, 6-этил, 6-изопропил или 6-н-бутил) производные аденина и гуанина, 2-алкил (например, 2-метил, 2-этил, 2-изопропил или 2-н-бутил) и другие алкильные производные аденина и гуанина,

2-тиоурацил, 2-тиотимин, 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил, цитозин, 5-пропилнилурацил, 5-пропинилцитозин, 6-азо урацил, 6-азо цитозин, 6-азо тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген, 8-амино, 8-сульфгидрил, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген (например, 5-бром), 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-дезазагуанин, 7-дезазааденин, 3-дезазагуанин и 3-дезазааденин.

В некоторых вариантах 5' и/или 3' конец антисмысловой цепи могут включать лишённые азотистого основания остатки (Ab), которые могут быть также названы «лишённым азотистого основания сайтом» или «лишённым азотистого основания нуклеотидом». Лишённый азотистого основания остаток (Ab) означает нуклеотид или нуклеозид, который не содержит азотистое основание в 1' положении сахаридного фрагмента. В некоторых вариантах лишённый азотистого основания остаток может располагаться внутри нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах Ab или AbAb могут быть добавлены с 3' конца антисмысловой цепи. В некоторых вариантах смысловая цепь может включать один или более дополнительных лишённых азотистого основания остатков (например, (Ab) или (AbAb)). В некоторых вариантах UUAb, UAb или Ab добавлены с 3' конца смысловой цепи. В некоторых вариантах лишённый азотистого основания (дезоксирибоза) остаток можно заменить на остаток рибитола (лишённая азотистого основания рибоза).

В некоторых вариантах все или в основном все нуклеотиды агента РНКи являются модифицированными нуклеотидами. Как описано в данном контексте, агент РНКи, в котором в основном все присутствующие нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами, представляет собой агент РНКи, включающий четыре или менее (то есть 0, 1, 2, 3 или 4) нуклеотида в обеих смысловой и антисмысловой цепях являются рибонуклеотидами (то есть немодифицированными). Как описано в данном контексте, смысловая цепь, в которой в основном все присутствующие нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами, представляет собой смысловую цепь, включающую два или менее (то есть 0, 1 или 2) нуклеотида в смысловой цепи, которые являются немодифицированными рибонуклеотидами. Как описано в данном контексте, антисмысловая цепь и смысловая цепь, в которой в основном все присутствующие нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами,

представляет собой антисмысловую цепь, включающую два или менее (то есть 0, 1 или 2) нуклеотида в смысловой цепи, которые являются немодифицированными рибонуклеотидами. В некоторых вариантах один или более нуклеотидов в агенте РНКи являются немодифицированными рибонуклеотидами. Химические структуры определенных модифицированных нуклеотидов представлены в данном контексте в табл. 6.1.

Модифицированные межнуклеозидные связи

В некоторых вариантах один или более нуклеотидов агента DUX4 РНКи присоединены через нестандартные связи или цепи (то есть модифицированные межнуклеозидные связи или модифицированные цепи). Модифицированные межнуклеозидные связи или цепи включают, но не ограничиваясь только ими, фосфоротиоатные группы (представленные в данном контексте буквой “s” в нижнем регистре), хиральные фосфотиоаты, тиофосфаты, фосфородитиоаты, сложные фосфотриэфиры, аминокилфосфотриэфиры, дифосфоротиоаты, алкилфосфонаты (например, метилфосфонаты или 3'-алкиленфосфонаты, хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфороамидаты (например, 3'-аминофосфороамидат, аминокилфосфороамидаты или тионофосфороамидаты), тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры, морфолиновые связи, боранофосфонаты, включающие нормальные 3'-5'-связанные аналоги боранофосфатов или боранофосфаты, характеризующиеся инвертированной полярностью, где соседние пары нуклеозидных звеньев соединены от 3'-5' к 5'-3' концу или от 2'-5' к 5'-2' концу. В некоторых вариантах модифицированные межнуклеозидные связи или цепи лишены атома фосфора. Модифицированные межнуклеозидные связи, лишенные атома фосфора, включают, но не ограничиваясь только ими, короткоцепные алкильные или циклоалкильные межсахаридные связи, смешанные гетероатомные и алкильные или циклоалкильные межсахаридные связи, или одну или более короткоцепных гетероатомных или гетероциклических межсахаридных связей. В некоторых вариантах модифицированные межнуклеозидные цепи включают, но не ограничиваясь только ими, силоксановые цепи, сульфидные цепи, сульфоксидные цепи, сульфоновые цепи, фомацетильные и тиофомацетильные цепи, метиленфомацетильные и тиофомацетильные цепи, алкен-содержащие цепи, сульфаматные цепи, метилениминовые и метиленигидразиновые цепи,

сульфонатные и сульфонамидные цепи, амидные цепи и другие цепи, включающие смешанные N, O, S и CH₂ компоненты.

В некоторых вариантах смысловая цепь агента DUX4 РНКи может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфоротиоатных связей, антисмысловая цепь агента DUX4 РНКи может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфоротиоатных связей, или обе смысловая цепь и антисмысловая цепь могут независимо содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфоротиоатных связей. В некоторых вариантах, смысловая цепь агента DUX4 РНКи может содержать 1, 2, 3 или 4 фосфоротиоатных связей, антисмысловая цепь агента DUX4 РНКи может содержать 1, 2, 3 или 4 фосфоротиоатных связей, или обе смысловая и антисмысловая цепь могут независимо содержать 1, 2, 3 или 4 фосфоротиоатных связей.

В некоторых вариантах смысловая цепь агента DUX4 РНКи содержит по меньшей мере две фосфоротиоатных межнуклеотидных связи. В некоторых вариантах межнуклеотидные фосфоротиоатные связи расположены между нуклеотидами в положениях 1-3 от 3' конца смысловой цепи. В некоторых вариантах одна фосфоротиоатная межнуклеотидная связь расположена на 5' конце нуклеотидной последовательности смысловой цепи, а другая фосфоротиоатная связь расположена на 3' конце нуклеотидной последовательности смысловой цепи. В некоторых вариантах две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи расположены на 5' конце смысловой цепи, а другая фосфоротиоатная связь расположена на 3' конце смысловой цепи. В некоторых вариантах смысловая цепь не включает никакой фосфоротиоатной межнуклеотидной связи между нуклеотидами, но содержит одну, две или три фосфоротиоатных связей между концевыми нуклеотидами на обоих 5' конце и 3' конце, и необязательно присутствуют инвертированные лишённые азотистого основания концевые кэпы. В некоторых вариантах направляющий лиганд присоединен к смысловой цепи через фосфоротиоатную цепь.

В некоторых вариантах антисмысловая цепь агента DUX4 РНКи содержит четыре фосфоротиоатных связи. В некоторых вариантах четыре межнуклеотидные фосфоротиоатные связи расположены между нуклеотидами в положениях 1-3 от 5' конца антисмысловой цепи и в положениях 19-21, 20-22, 21-23, 22-24, 23-25 или 24-26 от 5' конца. В некоторых вариантах три межнуклеотидных фосфоротиоатных связей расположены между положениями 1-4 от 5' конца антисмысловой цепи, а четвертая межнуклеотидная

фосфоротиоатная связь расположена между положениями 20-21 от 5' конца антисмысловой цепи. В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи содержит по меньшей мере три или четыре межнуклеотидных фосфоротиоатных связей в антисмысловой цепи.

5 Кэпирующие остатки или фрагменты

В некоторых вариантах смысловая цепь может включать один или более кэпирующих остатков или фрагментов, которые в данной области техники иногда называют «кэп», «концевой кэп» или «кэпирующий остаток». Как описано в денном контексте, «кэпирующий остаток» означает ненуклеотидное
10 соединение или другой фрагмент, который можно включить в один или более конец нуклеотидной последовательности агента РНКи, раскрытого в данном контексте. Кэпирующий остаток может придавать агенту РНКи, в некоторых случаях, определенные благоприятные свойства, такие как, например, защиту от деградации эндонуклеазами. В некоторых вариантах инвертированные
15 лишенные азотистых оснований остатки (инвAb) (называемые также в данной области техники «инвертированные лишенные азотистых оснований остатки» добавлены в качестве кэпирующих остатков (см. табл. 6,1, см. например, статью F. Czauderna, Nucleic Acids Res., 31(11) 2705-2716 (2003); и патент США No. 5998203). Кэпирующие остатки в основном известны в данной области техники
20 и включают, например, инвертированные, лишенные азотистых оснований остатки, а также углеводородные цепи, такие как концевые группы C₃H₇ (пропил), C₆H₁₃ (гексил), или C₁₂H₂₅ (додецил). В некоторых вариантах кэпирующий остаток присутствует либо на 5' конце, 3' конце или на обоих 5' конце и 3' конце смысловой цепи. В некоторых вариантах 5' конец и/или 3' конец
25 смысловой цепи может включать один или более инвертированных, лишенных азотистых оснований фрагментов дезоксирибозы в качестве кэпирующих остатков.

В некоторых вариантах один или более инвертированных лишенных азотистых оснований остатков (инвAb) добавлены на 3' конец смысловой цепи.
30 В некоторых вариантах один или более инвертированных, лишенных азотистых оснований остатков (инвAb) добавлены на 5' конец смысловой цепи. В некоторых вариантах один или более инвертированных, лишенных азотистых оснований остатков или инвертированных, лишенных азотистых оснований сайтов включены между направляющим лигандом и нуклеотидной

последовательностью смысловой цепи агента РНКи. В некоторых вариантах один или более инвертированных, лишенных азотистых оснований остатков или инвертированных, лишенных азотистых оснований фрагментов вставлены между модулятором ФК/ФД и нуклеотидной последовательностью смысловой цепи агента РНКи. В некоторых вариантах включение одного или более инвертированных, лишенных азотистых оснований остатков или инвертированных, лишенных азотистых оснований сайтов на конце или вблизи него, или на концах смысловой цепи агента РНКи или вблизи них, позволяет повысить активность или другие требуемые свойства агента РНКи.

В некоторых вариантах один или более инвертированных, лишенных азотистых оснований остатков (инвAb) добавлены на 5' конец смысловой цепи. В некоторых вариантах один или более инвертированных, лишенных азотистых оснований остатков включены между направляющим лигандом и нуклеотидной последовательностью смысловой цепи агента РНКи. Инвертированные, лишенные азотистых оснований остатки могут быть присоединены через фосфатную, фосфоротиоатную (например, как описано в данном контексте в качестве остатков (инвAb), или другие межнуклеотидные связи. В некоторых вариантах включение одного или более инвертированных, лишенных азотистых оснований остатков на концевом конце или вблизи него, или на концевых концах смысловой цепи агента РНКи или вблизи них, позволяет повысить активность или другие требуемые свойства агента РНКи. В некоторых вариантах инвертированный, лишенный азотистых оснований остаток (дезоксирибоза) можно заменить на инвертированный остаток рибитола (лишенную азотистого основания рибозу). В некоторых вариантах 3' конец последовательности корового тяжа антисмысловой цепи или 3' конец последовательности антисмысловой цепи может включать инвертированный, лишенный азотистого основания остаток. Химические структуры инвертированных, лишенных азотистых оснований остатков дезоксирибозы представлены ниже в табл. 6.1.

Агенты DUX4 РНКи

Варианты агента DUX4 РНКи, описанные в данном контексте, были сконструированы для направления на специфические положения в гене *DUX4* (то есть специфические положения в транскрипте гена *DUX4*. Как описано в данном контексте, последовательность антисмысловой цепи сконструирована для направления на ген *DUX4* в конкретное положение в гене *DUX4*, когда 5'

концевое азотистое основание антисмысловой цепи выровнено с положением, которое находится на 21 нуклеотид правее (по направлению к 3'-концу) от положения в гене при спаривании оснований с геном. Например, как показано в табл. 1 и табл. 2 в данном контексте, чтобы последовательность антисмысловой цепи сконструировать для направления в ген *DUX4* в положении 408, при спаривании основания с геном требуется, чтобы 5'-концевое азотистое основание антисмысловой цепи было выровнено в положении 428 гена *DUX4*.

Как описано в данном контексте, в конкретных вариантах, описанных в данном контексте, для агента DUX4 РНКи не требуется, чтобы азотистое основание в положении 1 (5' → 3') антисмысловой цепи было комплементарным гену, при условии, что наблюдается комплементарность по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%) антисмысловой цепи и последовательности корового тяжа гена длиной по меньшей мере 16 последовательных нуклеотидов. Например, для агента DUX4 РНКи, описанного в данном контексте, который сконструирован для направления в положение 408 в гене *DUX4*, 5' концевое азотистое основание агента DUX4 РНКи необходимо совместить с положением 428 в гене, однако 5' концевое азотистое основание антисмысловой цепи может быть, но необязательно, комплементарным с положением 428 в гене *DUX4*, при условии, что наблюдается комплементарность по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%) антисмысловой цепи и последовательности корового тяжа гена длиной по меньшей мере 16 последовательных нуклеотидов. Как указано, помимо прочего, в различных примерах, представленных в данном контексте, специфический сайт связывания гена с антисмысловой цепью агента DUX4 РНКи (например, если агент DUX4 РНКи сконструирован для направления в ген *DUX4* в положении 408, в положении 1437 или в определенном другом положении) имеет значение контролировать ингибирование, которое достигается с помощью агента DUX4 РНКи.

В некоторых вариантах агенты DUX4 РНКи, описанные в данном контексте, направленные на ген *DUX4* в положениях последовательности DUX4 или вблизи них, указаны в табл. 1. В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи, описанный в данном контексте, включает последовательность корового тяжа, которая полностью, в значительной степени или по меньшей мере частично,

является комплементарной для направления к 19-членной последовательности DUX4, указанной в табл. 1.

Таблица 1

DUX4 19-членные последовательности-мишени мРНК (взяты из двойного гена гомеобокс 4, варианта транскрипта 2, *homo sapiens*, GenBank NM_001293798.2)

SEQ ID No.	19-членные направленные последовательности-мишени DUX4 (5' → 3')	Соответствующие положения в последовательно-сти SEQ ID NO: 1	Положение в гене-мишени (как указано в данном контексте)
3	GGAUUCAGAUCUGGUUUCA	408-428	408
4	GAUUCAGAUCUGGUUUCAA	409-429	409
5	CCUUGUUCUCCGUGAAAU	1433-1453	1433
6	GUUCUCCGUGAAAUUCUA	1437-1457	1437
7	ACCUGGAUUAGAGUUACAU	1496-1516	1496
8	CUGGAUGAUUAGUUCAGAA	1518-1538	1518
9	AUGAUUAGUUCAGAGAUAU	1522-1542	1522

В некоторых вариантах агент РНКи DUX4 включает антисмысловую цепь, где нуклеотид в положении 19 антисмысловой цепи (5'→3') способен

образовывать пару оснований с нуклеотидом в положении 1 19-членной последовательности-мишени, раскрытой в таблице 1. В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи включает антисмысловую цепь, где нуклеотид в положении 1 антисмысловой цепи (5'→3') способен образовывать пару оснований с нуклеотидом в положении 19 19-членной последовательности-мишени, описанных в таблице 1.

В некоторых вариантах агент РНКи DUX4 включает антисмысловую цепь, где нуклеотид в положении 2 антисмысловой цепи (5'→3') способен образовывать пару оснований с нуклеотидом в положении 18 19-членной последовательности-мишени, описанной в таблице 1. В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи включает антисмысловую цепь, где нуклеотиды в положениях 2-18 антисмысловой цепи (5'→3') способны образовывать пару оснований с каждым из соответственно комплементарных нуклеотидов, расположенных в положении 18-2 19-членной последовательности-мишени, описанной в таблице 1.

В агентах РНКи, описанных в данном контексте, нуклеотид в положении 1 антисмысловой цепи (от 5' конца → до 3' конца) может являться комплементарным с геном *DUX4* или не-комплементарным с геном *DUX4*. В

некоторых вариантах нуклеотид в положении 1 антисмысловой цепи представляет собой U, A или dT. В некоторых вариантах нуклеотид в положении 1 антисмысловой цепи (от 5' конца → до 3' конца) формирует пары оснований A:U или U:A со смысловой цепью.

5 В некоторых вариантах антисмысловая цепь агента DUX4 РНКи включает последовательность нуклеотидов (от 5' конца → до 3' конца) 2-18 или 2-19 любой из последовательностей антисмысловой цепи, указанных в табл. 1, табл. 3 или табл. 5.4. В некоторых вариантах смысловая цепь агента DUX4 РНКи включает последовательность нуклеотидов (от 5' конца → до 3' конца) 1-17, 1-18 или 2-18
10 или любой из последовательностей смысловой цепи, указанных в табл. 2, или табл. 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 или 5.4.

В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи состоит (i) из антисмысловой цепи, включающей последовательность нуклеотидов (от 5' конца → до 3' конца) 2-18 или 2-19 любой из последовательностей антисмысловой цепи, указанных в
15 табл. 2 и табл. 3, и (ii) из смысловой цепи, включающей последовательность нуклеотидов (от 5' конца → до 3' конца) 1-17 или 1-18 любой из последовательностей смысловой цепи, указанных в табл. 2, или табл. 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 или 5.4.

В некоторых вариантах агенты РНКи DUX4 включают последовательности
20 нуклеотидов 19-членного корового тяжа, указанных в следующей табл. 2.

Таблица 2

Нуклеотидные последовательности корового тяжа антисмысловой и смысловой цепей агента РНК DUX4 (N означает любое азотистое основание)

SEQ ID NO:.	Нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи (5' → 3') (Представлена в виде немодифицированной нуклеотидной последовательности)	SEQ ID NO:.	Нуклеотидная последовательность смысловой цепи (5' → 3') (Представлена в виде немодифицированной нуклеотидной последовательности)	Соответств. положения идентифиц. последов-ти SEQ ID NO: 1	Положение гена-мишени
10	UGAAACCAGAUUCUGAAUCC	38	GGAUUCAGAUUCGGUUUCA	410-428	408
11	AGAAACCAGAUUCUGAAUCC	39	GGAUUCAGAUUCGGUUUCU	410-428	408
12	NGAAACCAGAUUCUGAAUCC	40	GGAUUCAGAUUCGGUUUCN	410-428	408
13	NGAAACCAGAUUCUGAAUCN	41	NGAUUCAGAUUCGGUUUCN	410-428	408
14	UUGAAACCAGAUUCUGAAUC	42	GAUUCAGAUUCGGUUUCAA	411-429	409
15	AUGAAACCAGAUUCUGAAUC	43	GAUUCAGAUUCGGUUUCAU	411-429	409
16	NUGAAACCAGAUUCUGAAUC	44	GAUUCAGAUUCGGUUUCAN	411-429	409
17	NUGAAACCAGAUUCUGAAUN	45	NAUUCAGAUUCGGUUUCAN	411-429	409
18	AUUUCACGGAAGAACAAGG	46	CCUUGUUCUCCGUGAAAU	1435-1453	1433
19	UUUUCACGGAAGAACAAGG	47	CCUUGUUCUCCGUGAAAA	1435-1453	1433
20	NUUUCACGGAAGAACAAGG	48	CCUUGUUCUCCGUGAAAN	1435-1453	1433
21	NUUUCACGGAAGAACAAGN	49	NCUUGUUCUCCGUGAAAN	1435-1453	1433
22	UAGAAUUUCACGGAAGAAC	50	GUUCUUCCGUGAAAUUCUA	1439-1457	1437
23	AAGAAUUUCACGGAAGAAC	51	GUUCUUCCGUGAAAUUCUU	1439-1457	1437
24	NAGAAUUUCACGGAAGAAC	52	GUUCUUCCGUGAAAUUCUN	1439-1457	1437
25	NAGAAUUUCACGGAAGAAAN	53	NUUCUUCCGUGAAAUUCUN	1439-1457	1437
26	AUGUAACUCUAAUCCAGGU	54	ACCUGGAUUAGAGUUACAU	1498-1516	1496
27	UUGUAACUCUAAUCCAGGU	55	ACCUGGAUUAGAGUUACAA	1498-1516	1496
28	NUGUAACUCUAAUCCAGGU	56	ACCUGGAUUAGAGUUACAN	1498-1516	1496

SEQ ID NO:.	Нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи (5' → 3') (Представлена в виде немодифицированной нуклеотидной последовательности)	SEQ ID NO:.	Нуклеотидная последовательность смысловой цепи (5' → 3') (Представлена в виде немодифицированной нуклеотидной последовательности)	Соответств. положения идентифиц. последов-ти SEQ ID NO: 1	Положение гена-мишени
29	NUGU AACUCUAAUCCAGGN	57	NCCUGGAUUAGAGUUACAN	1498-1516	1496
30	UUCUGAACUAAUCAUCCAG	58	CUGGAUGAUUAGUUCAGAA	1520-1538	1518
31	AUCUGAACUAAUCAUCCAG	59	CUGGAUGAUUAGUUCAGAU	1520-1538	1518
32	NUCUGAACUAAUCAUCCAG	60	CUGGAUGAUUAGUUCAGAN	1520-1538	1518
33	NUCUGAACUAAUCAUCCAN	61	NUGGAUGAUUAGUUCAGAN	1520-1538	1518
34	AUAUCUCUGAACUAAUCAU	62	AUGAUUAGUUCAGAGAUAU	1524-1542	1522
35	UUAUCUCUGAACUAAUCAU	63	AUGAUUAGUUCAGAGAUAA	1524-1542	1522
36	NUAUCUCUGAACUAAUCAU	64	AUGAUUAGUUCAGAGAUAN	1524-1542	1522
37	NUAUCUCUGAACUAAUCAN	65	NUGAUUAGUUCAGAGAUAN	1524-1542	1522

Смысловые цепи и антисмысловые цепи агента РНКи DUX4, которые содержат или состоят из нуклеотидных последовательностей, указанных в таблице 2, могут являться модифицированными нуклеотидами или немодифицированными нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты РНКи DUX4, характеризующиеся наличием последовательностей смысловой и антисмысловой цепей, которые включают или состоят из любой из последовательностей нуклеотидов из таблицы 2, все или практически все представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В некоторых вариантах антисмысловая цепь агента РНКи DUX4, описанная в данном контексте, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей антисмысловой цепи из таблицы 2. В некоторых вариантах смысловая цепь агента РНКи DUX4, описанная в данном контексте, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей смысловой цепи из таблицы 2.

Как применяется в данном контексте, каждый N, указанный в последовательности, раскрытой в таблице 2, является независимо выбранным из любых и всех азотистых оснований (включая обнаруженные как в модифицированных, так и в немодифицированных нуклеотидах). В некоторых вариантах нуклеотид N, указанный в последовательности, раскрытой в таблице 2, характеризуется наличием азотистого основания, комплементарного нуклеотиду N в соответствующем положении на другой цепи. В некоторых вариантах нуклеотид N, указанный в последовательности, раскрытой в таблице 2, характеризуется наличием азотистого основания, которое не комплементарно нуклеотиду N в соответствующем положении на другой цепи. В некоторых вариантах нуклеотид N, указанный в последовательности, раскрытой в таблице 2, характеризуется наличием такого же азотистого основания, как и нуклеотид N в соответствующем положении на другой цепи. В некоторых вариантах нуклеотид N, указанный в последовательности, раскрытой в таблице 2, характеризуется наличием азотистого основания, которое отличается от нуклеотида N в соответствующем положении на другой цепи.

Определенные модифицированные смысловые и антисмысловые цепи агента РНКи DUX4 представлены в таблице 3 и таблицах 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, а также 5.4. Модифицированные антисмысловые цепи агента РНКи DUX4, а также их исходные немодифицированные последовательности азотистых

оснований представлены в таблице 3. Модифицированные смысловые цепи агента РНКи DUX4, а также их исходные немодифицированные последовательности азотистых оснований представлены в таблицах 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 и 5.4. При формировании агентов РНКи DUX4 каждый из

5 нуклеотидов в каждой из исходных последовательностей оснований, перечисленных в таблице 3, в таблицах 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 и 5.4, а также выше в таблице 2, может являться модифицированным нуклеотидом.

Агенты РНКи DUX4, описанные в данном контексте, образуются с использованием отжига антисмысловой цепи со смысловой цепью. Смысловая

10 цепь, содержащая последовательность, указанную в таблице 2 или в таблицах 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 или 5.4, может являться гибридизованной с любой антисмысловой цепью, содержащей последовательность, указанную в таблице 2, таблице 3 или таблице 5.4, при условии, что две последовательности характеризуются наличием области по меньшей мере с 85%-ой

15 комплементарностью в отношении непрерывной последовательности из 16, 17, 18, 19, 20 или 21 нуклеотидов.

В некоторых вариантах антисмысловая цепь агента РНКи DUX4 содержит нуклеотидную последовательность любой из последовательностей, указанных в таблице 2, таблице 3 или таблице 5.4.

20 В некоторых вариантах агент DUX4 РНКи содержит или состоит из дуплекса, включающего последовательности азотистых оснований смысловой цепи и антисмысловой цепи любой из последовательностей, указанных в таблице 2, таблице 3 или в таблицах 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 или 5.4.

Примеры антисмысловых цепей, содержащих модифицированные

25 нуклеотиды, приведены в таблице 3. Примеры смысловых цепей, содержащих модифицированные нуклеотиды, представлены в таблицах 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 и 5.4.

В таблице 3 и таблицах 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 и 5.4 для обозначения модифицированных нуклеотидов, направляющих групп и связывающих групп

30 используются следующие обозначения:

A = аденозин-3'-фосфат

C = цитидин-3'-фосфат

G = гуанозин-3'-фосфат

U = уридин-3'-фосфат

	I = инозин-3'-фосфат
	a = 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат
	as = 2'-О-метиладенозин-3'-фосфотиоат
	c = 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат
5	cs = 2'-О-метилцитидин-3'-фосфотиоат
	g = 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат
	gs = 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфотиоат
	i = 2'-О-метиринозин-3'-фосфат
	is = 2'-О-метиринозин-3'-фосфотиоат
10	t = 2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
	ts = 2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
	u = 2'-О-метилуридин-3'-фосфат
	us = 2'-О-метилуридин-3'-фосфотиоат
	Af = 2'-фтораденозин-3'-фосфат
15	Afs = 2'-фтораденозин-3'-фосфотиоат
	Cf = 2'-фторцитидин-3'-фосфат
	Cfs = 2'-фторцитидин-3'-фосфотиоат
	Gf = 2'-фторгуанозин-3'-фосфат
	Gfs = 2'-фторгуанозин-3'-фосфотиоат
20	Tf = 2'-фтор-5'-метилуридин-3'-фосфат
	Tfs = 2'-фтор-5'-метилуридин-3'-фосфотиоат
	Uf = 2'-фторуридин-3'-фосфат
	Ufs = 2'-фторуридин-3'-фосфотиоат
	dT = 2'-дезокситимидин-3'-фосфат
25	A _{UNA} = 2',3'-секо-аденозин-3'-фосфат
	A _{UNAS} = 2',3'-секо-аденозин-3'-фосфотиоат
	C _{UNA} = 2',3'-секо-цитидин-3'-фосфат
	C _{UNAS} = 2',3'-секо-цитидин-3'-фосфотиоат
	G _{UNA} = 2',3'-секо-гуанозин-3'-фосфат
30	G _{UNAS} = 2',3'-секо-гуанозин-3'-фосфотиоат
	U _{UNA} = 2',3'-секоуридин-3'-фосфат
	U _{UNAS} = 2',3'-секоуридин-3'-фосфотиоат
	a _{2N} = см. таблицу 6.1
	a _{2Ns} = см. таблицу 6.1

(invAb) = инвертированный дезоксирибонуклеотид-5'-фосфат с удаленным азотистым основанием, см. таблицу 6.1

(invAb)s = инвертированный дезоксирибонуклеотид-5'-фосфотиоат с удаленным азотистым основанием, см. таблицу 6.1

5 s = фосфоротииоатная связь

p = концевой фосфат (получен в результате синтеза)

vpdN = дезоксирибонуклеотид винилфосфоната

cPrpa = 5'-циклопропилфосфонат-2'-О-метиладенозин-3'-фосфат (см. таблицу 6.1)

10 cPrpas = 5'-циклопропилфосфонат-2'-О-метиладенозин-3'-фосфотиоат (см. таблицу 6.1)

cPrpu = 5'-циклопропилфосфонат-2'-О-метилуридин-3'-фосфат (см. таблицу 6.1)

15 cPrpus = 5'-циклопропилфосфонат-2'-О-метилуридин-3'-фосфотиоат (см. таблицу 6.1)

aAlk = 2'-О-пропаргиладенозин-3'-фосфат, см. таблицу 6.1.

aAlks = 2'-О-пропаргиладенозин-3'-фосфотиоат, см. таблицу 6.1.

cAlk = 2'-О-пропаргилцитидин-3'-фосфат, см. таблицу 6.1.

cAlks = 2'-О-пропаргилцитидин-3'-фосфотиоат, см. таблицу 6.1.

20 gAlk = 2'-О-пропаргилгуанозин-3'-фосфат, см. таблицу 6.1.

gAlks = 2'-О-пропаргилгуанозин-3'-фосфотиоат, см. таблицу 6.1.

tAlk = 2'-О-пропаргил-5-метилуридин-3'-фосфат, см. таблицу 6.1.

tAlks = 2'-О-пропаргил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат, см. таблицу 6.1.

uAlk = 2'-О-пропаргилуридин-3'-фосфат, см. таблицу 6.1.

25 uAlks = 2'-О-пропаргилуридин-3'-фосфотиоат, см. таблицу 6.1.

(Alk-SS-C6) = см. таблицу 6.1

(C6-SS-Alk) = см. таблицу 6.1

(C6-SS-C6) = см. таблицу 6.1

(6-SS-6) = см. таблицу 6.1

30 (C6-SS-Alk-Me) = см. таблицу 6.1.

(NH₂-C6) = см. таблицу 6.1

(Alk-сyHex) = см. таблицу 6.1.

(Alk-сyHex)s = см. таблицу 6.1.

Как представляется очевидным специалисту в данной области техники, если иное не указано для последовательности (такой как, например, как фосфоротиаонатная связь «s»), когда она присутствует в олигонуклеотиде, нуклеотидные мономеры взаимно связаны 5'-3'-фосфодиэфирными связями. Как

5 представляется очевидным специалисту в данной области техники, включение фосфоротиаонатной связи, как показано в раскрытых в данном контексте модифицированных нуклеотидных последовательностях, заменяет фосфодиэфирную связь, обычно присутствующую в олигонуклеотидах. Кроме того, специалисту в данной области техники представляется очевидным, что

10 концевой нуклеотид на 3'-конце данной олигонуклеотидной последовательности обычно характеризуется наличием гидроксильной (-ОН) группы в соответствующем 3'-положении данного мономера вместо фосфатного фрагмента *ex vivo*. Более того, как должно быть понятно и очевидно специалисту в данной области техники, в то время как в фосфоротиаонатных

15 химических структурах, представленных в данном контексте, анион обычно показан на атоме серы, раскрытые в данном контексте изобретения охватывают все фосфоротиаонатные таутомеры (например, такие, где атом серы характеризуется наличием двойной связи и анион присутствует на атоме кислорода). Если в данном контексте прямо не указано иное, такие

20 интерпретации специалистов в данной области техники используются при описании агентов РНКи DUX4 и композиций агентов РНКи DUX4, раскрытых в данном контексте.

Некоторые примеры направляющих групп и связывающих групп, используемых в агентах РНКи DUX4, раскрытыми в данном контексте,

25 включены в химические структуры, представленные ниже в таблице 6.1. Каждая смысловая цепь и/или антисмысловая цепь может включать любые направляющие группы или связывающие группы, перечисленные в данном контексте, а также другие направляющие группы или связывающие группы, конъюгированные с 5'- и/или 3'-концом последовательности.

Таблица 3

Последовательности антисмысловых цепей агента РНКи DUX4.

ID анти- смысловой цепи	Модифицированная антисмысловая цепь (5' → 3')	SEQ ID NO:	Исходная последовательность оснований (5' → 3') (показана как немодифицированная нуклеотидная последовательность)	SEQ ID NO:
AM09247-AS	usGfsasAfaCfcAfgAfuCfuGfaAfuCfcUfsg	66	UGAAACCAGAUUCUGAAUCCUG	162
AM09250-AS	usUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsu	67	UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCU	163
AM09252-AS	usAfsgsAfaUfuUfcAfcGfgAfaGfaAfcAfsg	68	UAGAAUUUCACGGAAGAACAG	164
AM09260-AS	usUfscsUfgAfaCfuAfaUfcAfuCfcAfgGfsa	69	UUCUGAACUAAUCAUCCAGGA	165
AM10009-AS	asUfsusUfcAfcGfgAfaGfaAfcAfaGfgGfsc	70	AUUUCACGGAAGACAAGGGC	166
AM10019-AS	asUfsgsUfaAfcUfcUfaAfuCfcAfgGfuUfsu	71	AUGUAAUCUCUAAUCCAGGUUU	167
AM10023-AS	asUfsasUfcUfcUfgAfaCfuAfaUfcAfuCfsc	72	AUAUCUCUGAACUAAUCAUCC	168
AM10026-AS	cPrpusAfsgsAfaUfuUfcAfcGfgAfaGfaAfcAfsg	73	UAGAAUUUCACGGAAGAACAG	164
AM10028-AS	cPrpusUfscsUfgAfaCfuAfaUfcAfuCfcAfgGfsa	74	UUCUGAACUAAUCAUCCAGGA	165
AM10029-AS	cPrpusGfsasAfaCfcAfgAfuCfuGfaAfuCfcUfsg	75	UGAAACCAGAUUCUGAAUCCUG	162
AM10030-AS	cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsu	76	UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCU	163
AM10159-AS	usUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsc	77	UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCC	169
AM10195-AS	cPrpasUfsusUfcAfcGfgAfaGfaAfcAfaGfgGfsc	78	AUUUCACGGAAGACAAGGGC	166
AM10197-AS	cPrpasUfsgsUfaAfcUfcUfaAfuCfcAfgGfuUfsu	79	AUGUAAUCUCUAAUCCAGGUUU	167
AM10199-AS	cPrpasUfsasUfcUfcUfgAfaCfuAfaUfcAfuCfsc	80	AUAUCUCUGAACUAAUCAUCC	168
AM10251-AS	usAfsgsaauuucacGfgAfaGfaacacg	81	UAGAAUUUCACGGAAGAACAG	164

AM10252-AS	usAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg	82	UAGAAUUUCACGGAAGAACAG	164
AM10260-AS	usUfscsugaacuaaUfcAfuCfcaggsa	83	UUCUGAACUAAUCAUCCAGGA	165
AM10378-AS	cPrpusAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg	84	UAGAAUUUCACGGAAGAACAG	164
AM10380-AS	usAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasc	85	UAGAAUUUCACGGAAGAACAC	170
AM10381-AS	cPrpusAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasc	86	UAGAAUUUCACGGAAGAACAC	170
AM10464-AS	cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsc	87	UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCC	169
AM10564-AS	usUfsgsaaaccagaUfcUfgAfauccsc	88	UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCC	169
AM10565-AS	cPrpusUfsgsaaaccagaUfcUfgAfauccsc	89	UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCC	169
AM10566-AS	usUfsgsaaacCfaGfaUfcUfgAfauccsc	90	UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCC	169
AM10567-AS	cPrpusUfsgsaaacCfaGfaUfcUfgAfauccsc	91	UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCC	169
AM10645-AS	cPrpusUfscsugaacuaaUfcAfuCfcaggsa	92	UUCUGAACUAAUCAUCCAGGA	165
AM10646-AS	cPrpusAfsgsaauuucacGfgAfaGfaacasg	93	UAGAAUUUCACGGAAGAACAG	164
AM10647-AS	usAfsgsaauuucacGfgAfaGfaacasc	94	UAGAAUUUCACGGAAGAACAC	170
AM10648-AS	cPrpusAfsgsaauuucacGfgAfaGfaacasc	95	UAGAAUUUCACGGAAGAACAC	170
AM10850-AS	usGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg	96	UGAAACCAGAUUCUGAAUCCUG	162
AM10851-AS	cPrpusGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg	97	UGAAACCAGAUUCUGAAUCCUG	162
AM10852-AS	usGfsasAfaccagauCfuGfaAfuccusg	98	UGAAACCAGAUUCUGAAUCCUG	162
AM10853-AS	cPrpusGfsasAfaccagauCfuGfaAfuccusg	99	UGAAACCAGAUUCUGAAUCCUG	162
AM10948-AS	cPrpusAfsgsAfauuucacGfgAfaGfaacasg	100	UAGAAUUUCACGGAAGAACAG	164
AM10949-AS	cPrpusAfsGfsaauuucacGfgAfaGfaacasg	101	UAGAAUUUCACGGAAGAACAG	164

Таблица 4.1

Последовательности смысловой цепи агента РНКи DUX4

ID смысловой цепи	Модифицированная смысловая цепь (5' → 3')	SEQ ID NO:	Исходная последовательность оснований (5' → 3') (показана как немодифицированная нуклеотидная последовательность)	SEQ ID NO:
AM09965-SS	(NH2-C6)s(invAb)scaggauucAfGfAfucugguuucas(invAb)(C6-SS-C6)dT	102	CAGGAUUCAGAUUCUGGUUUCAT	171
AM09966-SS	(NH2-C6)s(invAb)saggauucaGfAfUfcugguuucas(invAb)(C6-SS-C6)dT	103	AGGAUUCAGAUUCUGGUUUCAAT	172
AM09967-SS	(NH2-C6)s(invAb)scuguucuuCfCfGfugaaaucuas(invAb)(C6-SS-C6)dT	104	CUGUUCUUCGUGAAAUUCUAT	173
AM09968-SS	(NH2-C6)s(invAb)succuggauGfAfUfuaguucagaas(invAb)(C6-SS-C6)dT	105	UCCUGGAUGAUUAGUUCAGAAT	174
AM10194-SS	(NH2-C6)s(invAb)sgcccuuguUfCfUfuccgugaaaus(invAb)(C6-SS-C6)dT	106	GCCCUUGUUCUUCGUGAAAUT	175
AM10196-SS	(NH2-C6)s(invAb)sa_2NaaccuggAfUfUfagaguuacaus(invAb)(C6-SS-C6)dT	107	(A ^{2N})AACCUGGAUUAGAGUUACAUT	176
AM10198-SS	(NH2-C6)s(invAb)sggaugauuAfGfUfucagagauaus(invAb)(C6-SS-C6)dT	108	GGAUGAUUAGUUCAGAGUAUT	177
AM10379-SS	(NH2-C6)s(invAb)sguguucuuCfCfGfugaaaucuas(invAb)(C6-SS-C6)dT	109	GUGUUCUUCGUGAAAUUCUAT	178
AM10382-SS	(NH2-C6)s(invAb)sguguucUfuCfCfugaaaucuas(invAb)(C6-SS-C6)dT	110	GUGUUCUUCGUGAAAUUCUAT	178
AM10463-SS	(NH2-C6)s(invAb)sgggauucaGfAfUfcugguuucas(invAb)(C6-SS-C6)dT	111	GGGAUUCAGAUUCUGGUUUCAAT	179
AM10465-SS	(NH2-C6)s(invAb)sa_2NggauucaGfAfUfcugguuucas(invAb)(C6-SS-C6)dT	112	(A ^{2N})GGAUUCAGAUUCUGGUUUCAAT	238
AM10568-SS	(NH2-C6)s(invAb)sgggauucaGfaUfcugguuucas(invAb)(C6-SS-C6)dT	113	GGGAUUCAGAUUCUGGUUUCAAT	179

AM10569-SS	(NH2-C6)s(invAb)sgggauucaGfaUfCfugguuucaas(invAb)(C6-SS-C6)dT	114	GGGAUUCAGAUCUGGUUCAAT	179
AM10854-SS	(NH2-C6)s(invAb)scaggauucAfGfAfucugiuuucas(invAb)(C6-SS-C6)dT	115	CAGGAUUCAGAUCUGIUUCAT	180
AM10950-SS	(NH2-C6)s(invAb)scuguucuuCfcGfuGfaauucas(invAb)(C6-SS-C6)dT	116	CUGUUCUCCGUGAAAUUCUAT	173

(A^{2N}) представляет собой 2-аминоадениновый нуклеотид; I представляет собой инозиновый (гипоксантиновый) нуклеотид.

Как указано выше в таблице 4.1, приведенные в качестве примера нуклеотидные последовательности смысловой цепи агента РНКи DUX4 дополнительно включают реакционноспособные связывающие группы как на 5'-конце, так и на 3'-конце смысловой цепи. Например, последовательности

5 смысловой цепи агента РНКи DUX4, указанные выше в таблице 4.1, характеризуются наличием связывающей группы (NH₂-C₆) на 5'-конце нуклеотидной последовательности. Точно так же нуклеотидные последовательности агента РНКи DUX4, указанные выше в таблице 4.1, характеризуются наличием связывающей группы (C₆-SS-C₆) на 3'-конце

10 нуклеотидной последовательности. Такие реакционноспособные связывающие группы предназначены для ускорения связывания направляющих лигандов, направляющих групп и/или модуляторов ФК/ФД с агентами РНКи DUX4, раскрытыми в данном контексте. Реакции связывания или конъюгации хорошо известны в данной области техники и обеспечивают образование ковалентных

15 связей между двумя молекулами или реагентами. Пригодные реакции конъюгации для применения в рамках настоящего изобретения включают, но не ограничиваясь только ими, реакцию амидоконденсации, реакцию присоединения Михаэля, реакцию образования гидразона и клик-реакцию циклоприсоединения.

В некоторых вариантах направляющие лиганды можно синтезировать в

20 виде тетрафторфенилового (TFP) сложного эфира, который взаимодействует с аминогруппой (например, NH₂-C₆) для присоединения направляющего лиганда к агентам РНКи DUX4, раскрытым в данном контексте. В некоторых вариантах направляющие лиганды синтезируют в виде азидов, которые являются конъюгированными с пропаргильной группой или группой DBCO, например, с

25 помощью клик-реакции циклоприсоединения.

Кроме того, нуклеотидные последовательности, указанные в таблице 4.1, синтезировали с нуклеотидом dT на 3'-конце смысловой цепи, за которым следовал (3'→5') линкер (например, C₆-SS-C₆). Пригодную и коммерчески доступную смолу, нагруженную dT, можно использовать для инициации синтеза

30 олигонуклеотидной цепи. В некоторых вариантах линкер (C₆-SS-C₆) можно затем использовать для ускорения связывания с дополнительными компонентами, такими как, например, модулятор ФК/ФД или один или несколько направляющих лигандов. Как описано в данном контексте, C₆-SS-C₆ сначала восстанавливается, отщепляя, среди прочего, остаток dT от молекулы,

что затем может ускорить конъюгацию требуемого модулятора ФК/ФД. Ниже в таблице 4.2 указаны нуклеотидные последовательности, указанные выше в таблице 4.1, но без включения 3'-концевого нуклеотида dT, поскольку они надлежащим образом отражают последовательность агентов РНКи DUX4,

5 раскрытых в данном контексте, при доставке *in vivo*.

Дополнительно ниже в таблице 4.3 указаны нуклеотидные последовательности, указанные выше в таблице 4.1, но без концевых связывающих групп (т. е. нуклеотидные последовательности только с кэпирующими группами).

Таблица 4.2

Последовательности смысловой цепи агента РНК DUX4, показанные без 3'-концевого нуклеотида dT.

ID смысловой цепи:	Модифицированная смысловая цепь (5' → 3')	SEQ ID NO.	Исходная последовательность оснований (5' → 3') (показана как немодифицированная последовательность нуклеотидов)	SEQ ID NO.
AM09965-SS	(NH2-C6)s(invAb)scaggauucAfGfAfucugguuucas(invAb)(C6-SS-C6)	117	CAGGAUUCAGAUCUGGUUUCA	181
AM09966-SS	(NH2-C6)s(invAb)saggauucaGfAfUfcugguuucas(invAb)(C6-SS-C6)	118	AGGAUUCAGAUCUGGUUUCAA	182
AM09967-SS	(NH2-C6)s(invAb)scuguucuuCfCfGfugaaauucas(invAb)(C6-SS-C6)	119	CUGUUCUCCGUGAAAUUCUA	183
AM09968-SS	(NH2-C6)s(invAb)succuggauGfAfUfuaguucagaas(invAb)(C6-SS-C6)	120	UCCUGGAUGAUUAGUUCAGAA	184
AM10194-SS	(NH2-C6)s(invAb)sgcccuuguUfCfUfuccgugaaus(invAb)(C6-SS-C6)	121	GCCCUUGUUCUCCGUGAAAU	185
AM10196-SS	(NH2-C6)s(invAb)sa_2NaaccuggAfUfUfagaguuacaus(invAb)(C6-SS-C6)	122	(A ^{2N})AACCUGGAUUAGAGUUAC AU	186
AM10198-SS	(NH2-C6)s(invAb)sggaugauuAfGfUfucagagauaus(invAb)(C6-SS-C6)	123	GGAUGAUUAGUUCAGAGAUAU	187
AM10379-SS	(NH2-C6)s(invAb)sguguucuuCfCfGfugaaauucas(invAb)(C6-SS-C6)	124	GUGUUCUCCGUGAAAUUCUA	188
AM10382-SS	(NH2-C6)s(invAb)sguguucUfuCfcGfugaaauucas(invAb)(C6-SS-C6)	125	GUGUUCUCCGUGAAAUUCUA	188
AM10463-SS	(NH2-C6)s(invAb)sgggauucaGfAfUfcugguuucas(invAb)(C6-SS-C6)	126	GGAUUCAGAUCUGGUUUCAA	189
AM10465-SS	(NH2-C6)s(invAb)sa_2NggauucaGfAfUfcugguuucas(invAb)(C6-SS-C6)	127	(A ^{2N})GGAUUCAGAUCUGGUUUC AA	239
AM10568-	(NH2-C6)s(invAb)sgggauucaGfaUfcugguuucas(invAb)(C6-SS-C6)	128	GGAUUCAGAUCUGGUUUCAA	189

ID смысловой цепи:	Модифицированная смысловая цепь (5' → 3')	SEQ ID NO.	Исходная последовательность оснований (5' → 3') (показана как немодифицированная последовательность нуклеотидов)	SEQ ID NO.
SS				
AM10569- SS	(NH2-C6)s(invAb)sgggauucaGfaUfCfugguuucaas(invAb)(C6-SS-C6)	129	GGGAUUCAGAUUCUGGUUUCAA	189
AM10854- SS	(NH2-C6)s(invAb)scaggauucAfGfAfucugiuuucas(invAb)(C6-SS-C6)	130	CAGGAUUCAGAUUCUGIUUUCA	190
AM10950- SS	(NH2-C6)s(invAb)scuguucuuCfcGfuGfaaaucuas(invAb)(C6-SS-C6)	131	CUGUUCUCCGUGAAAUUCUA	183

(A^{2N}) представляет собой 2-аминоадениновый нуклеотид; I представляет собой инозиновый (гипоксантиновый) нуклеотид.

Таблица 4.3

Последовательности смысловой цепи агента РНКи DUX4, показанные без концевых связывающих групп.

ID смысловой цепи	Модифицированная смысловая цепь (5' → 3')	SEQ ID NO:	Исходная последовательность оснований (5' → 3') (показана как немодифицированная последовательность нуклеотидов)	SEQ ID NO:
AM09965-SS	(invAb)scaggauucAfGfAfucugguuucas(invAb)	132	CAGGAUUCAGAUCUGGUUUCA	181
AM09966-SS	(invAb)saggauucaGfAfUfcugguuucas(invAb)	133	AGGAUUCAGAUCUGGUUUCAA	182
AM09967-SS	(invAb)scuguucuuCfCfGfugaaaucuas(invAb)	134	CUGUUCUUCCGUGAAAUUCUA	183
AM09968-SS	(invAb)succuggauGfAfUfuaguucagaas(invAb)	135	UCCUGGAUGAUUAGUUCAGAA	184
AM10194-SS	(invAb)sgcccuuguUfCfUfuccgugaaus(invAb)	136	GCCCUUGUUCUUCCGUGAAAU	185
AM10196-SS	(invAb)sa_2NaaccuggAfUfUfagaguuacaas(invAb)	137	(A ^{2N})AACCUGGAUUAGAGUUACAU	186
AM10198-SS	(invAb)sggaugauuAfGfUfucagagauaus(invAb)	138	GGAUGAUUAGUUCAGAGAUAU	187
AM10379-SS	(invAb)sguguucuuCfCfGfugaaaucuas(invAb)	139	GUGUUCUUCCGUGAAAUUCUA	188
AM10382-SS	(invAb)sguguucUfuCfcGfugaaaucuas(invAb)	140	GUGUUCUUCCGUGAAAUUCUA	188
AM10463-SS	(invAb)sgggauucaGfAfUfcugguuucas(invAb)	141	GGGAUUCAGAUCUGGUUUCAA	189
AM10465-SS	(invAb)sa_2NggauucaGfAfUfcugguuucas(invAb)	142	(A ^{2N})GGAUUCAGAUCUGGUUUCAA	239
AM10568-SS	(invAb)sgggauucaGfaUfcugguuucas(invAb)	143	GGGAUUCAGAUCUGGUUUCAA	189
AM10569-SS	(invAb)sgggauucaGfaUfCfugguuucas(invAb)	144	GGGAUUCAGAUCUGGUUUCAA	189
AM10854-SS	(invAb)scaggauucAfGfAfucugiuucas(invAb)	145	CAGGAUUCAGAUCUGIUUUCA	190
AM10950-SS	(invAb)scuguucuuCfcGfuGfaaaucuas(invAb)	146	CUGUUCUUCCGUGAAAUUCUA	183

(A^{2N}) представляет собой 2-аминоадениновый нуклеотид; I представляет собой инозиновый (гипоксантиновый)

5 нуклеотид.

Таблица 4.4

Последовательности смысловой цепи агента РНК DUX4, показанные как модифицированные последовательности нуклеотидов (без концевых связывающих групп или инвертированных копирующих фрагментов с удаленным азотистым основанием).

ID смысловой цепи	Модифицированная смысловая цепь (5' → 3')	SEQ ID NO:	Исходная последовательность оснований (5' → 3') (показана как немодифицированная последовательность нуклеотидов)	SEQ ID NO:
AM09965-SS	caggauucAfGfAfucgguuuc	147	CAGGAUUCAGAUUCUGGUUUC	181
AM09966-SS	aggauucaGfAfUfcgguuuc	148	AGGAUUCAGAUUCUGGUUUC	182
AM09967-SS	cuguucuuCfCfGfugaaauuc	149	CUGUUCUCCGUGAAAUUC	183
AM09968-SS	uccuggauGfAfUfuaguucag	150	UCCUGGAUGAUUAGUUCAG	184
AM10194-SS	gcccuguUfCfUfuccgugaa	151	GCCCUUGUUCUCCGUGAAU	185
AM10196-SS	a_2NaaccuggAfUfUfagauuac	152	(A ^{2N})AACCUGGAUAGAGUAC	186
AM10198-SS	ggauuuAfGfUfucagagauu	153	GGAUGAUUAGUUCAGAGAU	187
AM10379-SS	guguucuuCfCfGfugaaauuc	154	GUGUUCUCCGUGAAAUUC	188
AM10382-SS	guguucUfCfCfGfugaaauuc	155	GUGUUCUCCGUGAAAUUC	188
AM10463-SS	ggauucaGfAfUfcgguuuc	156	GGGAUUCAGAUUCUGGUUUC	189
AM10465-SS	a_2NggauucaGfAfUfcgguuuc	157	(A ^{2N})GGAUUCAGAUUCUGGUUUC	239
AM10568-SS	ggauucaGfaUfcgguuuc	158	GGGAUUCAGAUUCUGGUUUC	189
AM10569-SS	ggauucaGfaUfCfugguuuc	159	GGGAUUCAGAUUCUGGUUUC	189
AM10854-SS	caggauucAfGfAfucgiuuuc	160	CAGGAUUCAGAUUCUGIUUC	190
AM10950-SS	cuguucuuCfCfGfGfaaauc	161	CUGUUCUCCGUGAAAUUC	183

5

(A^{2N}) представляет собой 2-аминоадениновый нуклеотид; I представляет собой инозиновый (гипоксантиновый) нуклеотид.

Как обсуждается в данном контексте, в некоторых вариантах изобретения один или более направляющих лигандов и/или модуляторов ФК/ФД связаны или конъюгированы с агентом РНКи. В некоторых вариантах направляющий лиганд (или направляющая группа) и/или модулятор ФК/ФД присоединен к 5'-концу

5 смысловой цепи, 3'-концу смысловой цепи и/или к одному или более внутренним нуклеотидов. Синтез смысловой цепи и/или антисмысловой цепи можно разработать таким образом, чтобы реакционноспособные группы были легко доступны для ускорения связывания с дополнительными компонентами, такими как направляющий лиганд или модулятор ФК/ФД. В следующей таблице 4.5

10 показана смысловая цепь агентов РНКи DUX4, описанных выше в таблице 4.1, после связывания с одним или более направляющими лигандами и/или модуляторами ФК/ФД (в совокупности показаны ниже как Z).

Фармакологические фрагменты связаны с агентами РНКи DUX4 с помощью реакций, описанных ниже в примере 1. После конъюгации с направляющими

15 лигандами связывающие группы могут характеризоваться наличием структур (NH-C6), (NH-C6)s или (C6-S), структура каждой из которых показана ниже в таблице 6.1.

Таблица 4.5

Последовательности смысловых цепей агента РНКи DUX4, с указанием

20 положения направляющего лиганда и/или модулятора ФК/ФД (Z = фармакологический фрагмент (например, направляющий лиганд, направляющая группа и/или модулятор ФК/ФД)).

ID смысловой цепи:	Модифицированная смысловая цепь (5' → 3')	SEQ ID NO.
AM09965-SS	Z-(NH-C6)s(inv Ab)scaggauucAfGfAfucugguuucas(inv Ab)(C6-S)-Z	191
AM09966-SS	Z-(NH-C6)s(inv Ab)saggauucaGfAfUfcugguuacaas(inv Ab)(C6-S)-Z	192
AM09967-SS	Z-(NH-C6)s(inv Ab)scuguucuuCfCfGfugaaauucas(inv Ab)(C6-S)-Z	193
AM09968-SS	Z-(NH-C6)s(inv Ab)succuggauGfAfUfuaguucagaas(inv Ab)(C6-S)-Z	194
AM10194-SS	Z-(NH-C6)s(inv Ab)sgcccuuguUfCfUfuccgugaaaus(inv Ab)(C6-S)-Z	195
AM10196-SS	Z-(NH-C6)s(inv Ab)sa_2NaaccuggAfUfUfagaguacaas(inv Ab)(C6-S)-Z	196
AM10198-SS	Z-(NH-C6)s(inv Ab)sggaugauuAfGfUfucagagauaus(inv Ab)(C6-S)-Z	197
AM10379-SS	Z-(NH-C6)s(inv Ab)sguguucuuCfCfGfugaaauucas(inv Ab)(C6-S)-Z	198
AM10382-SS	Z-(NH-C6)s(inv Ab)sguguucUfuCfGfugaaauucas(inv Ab)(C6-S)-Z	199
AM10463-SS	Z-(NH-C6)s(inv Ab)sgggauucaGfAfUfcugguuacaas(inv Ab)(C6-S)-Z	200
AM10465-SS	Z-(NH-C6)s(inv Ab)sa_2NggauucaGfAfUfcugguuacaas(inv Ab)(C6-S)-Z	201

ID смысловой цепи:	Модифицированная смысловая цепь (5' → 3')	SEQ ID NO.
AM10568-SS	Z-(NH-C6)s(invAb)sgggauucaGfaUfcugguuucas(invAb)(C6-S)-Z	202
AM10569-SS	Z-(NH-C6)s(invAb)sgggauucaGfaUfcugguuucas(invAb)(C6-S)-Z	203
AM10854-SS	Z-(NH-C6)s(invAb)scaggauucAfGfAfucugiuucas(invAb)(C6-S)-Z	204
AM10950-SS	Z-(NH-C6)s(invAb)scuguucuuCfcGfuGfaauucuas(invAb)(C6-S)-Z	205

Таблица 4.6

Последовательности смысловой цепи агента РНКи DUX4 с указанием направляющего лиганда, присоединенного к 5'-концу, и модулятор ФК/ФД, присоединенного к 3'-концам смысловой цепи. (*TL* = направляющий лиганд; *PK* = модулятор ФК/ФД)).

ID смысловой цепи:	Модифицированная смысловая цепь (5' → 3')	SEQ ID NO.
AM09965-SS	<i>TL</i> -(NH-C6)s(invAb)scaggauucAfGfAfucugguuucas(invAb)(C6-S)- <i>PK</i>	206
AM09966-SS	<i>TL</i> -(NH-C6)s(invAb)saggauucaGfAfUfcugguuucas(invAb)(C6-S)- <i>PK</i>	207
AM09967-SS	<i>TL</i> -(NH-C6)s(invAb)scuguucuuCfCfGfugaaauucuas(invAb)(C6-S)- <i>PK</i>	208
AM09968-SS	<i>TL</i> -(NH-C6)s(invAb)succuggauGfAfUfuaguucagaas(invAb)(C6-S)- <i>PK</i>	209
AM10194-SS	<i>TL</i> -(NH-C6)s(invAb)sgcccuuguUfCfUfuccgugaaus(invAb)(C6-S)- <i>PK</i>	210
AM10196-SS	<i>TL</i> -(NH-C6)s(invAb)sa_2NaaccuggAfUfUfagaguacaus(invAb)(C6-S)- <i>PK</i>	211
AM10198-SS	<i>TL</i> -(NH-C6)s(invAb)sggaugauuAfGfUfucagagauaus(invAb)(C6-S)- <i>PK</i>	212
AM10379-SS	<i>TL</i> -(NH-C6)s(invAb)sguguucuuCfCfGfugaaauucuas(invAb)(C6-S)- <i>PK</i>	213
AM10382-SS	<i>TL</i> -(NH-C6)s(invAb)sguguucUfCfGfugaaauucuas(invAb)(C6-S)- <i>PK</i>	214
AM10463-SS	<i>TL</i> -(NH-C6)s(invAb)sgggauucaGfAfUfcugguuucas(invAb)(C6-S)- <i>PK</i>	215
AM10465-SS	<i>TL</i> -(NH-C6)s(invAb)sa_2NggauucaGfAfUfcugguuucas(invAb)(C6-S)- <i>PK</i>	216
AM10568-SS	<i>TL</i> -(NH-C6)s(invAb)sgggauucaGfaUfcugguuucas(invAb)(C6-S)- <i>PK</i>	217
AM10569-SS	<i>TL</i> -(NH-C6)s(invAb)sgggauucaGfaUfcugguuucas(invAb)(C6-S)- <i>PK</i>	218
AM10854-SS	<i>TL</i> -(NH-C6)s(invAb)scaggauucAfGfAfucugiuucas(invAb)(C6-S)- <i>PK</i>	219
AM10950-SS	<i>TL</i> -(NH-C6)s(invAb)scuguucuuCfcGfuGfaauucuas(invAb)(C6-S)- <i>PK</i>	220

Агенты РНКи DUX4, описанные в данном контексте, образуются при отжиге антисмысловой цепи со смысловой цепью. Смысловая цепь, содержащая последовательность, указанную в таблице 2 или в таблице 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 или 5.4, является гибридизованной с любой антисмысловой цепью,

содержащей последовательность, указанную в таблице 2, таблице 3 или таблице 5.4, при условии, что две последовательности характеризуются наличием области по меньшей мере с 85%-ой комплементарностью в отношении непрерывной последовательности из 16, 17, 18, 19, 20 или 21 нуклеотида.

5 В некоторых вариантах антисмысловая цепь агента РНКи DUX4, описанная в данном контексте, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей антисмысловой цепи, указанных в таблице 3. В некоторых вариантах смысловая цепь агента РНКи DUX4, описанная в данном контексте, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей

10 смысловой цепи, указанных в таблицах 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 или 5.4.

В некоторых вариантах антисмысловая цепь агента РНКи DUX4 содержит любую нуклеотидную последовательность, указанную в таблице 2 или таблице 3. В некоторых вариантах антисмысловая цепь агента РНКи DUX4 содержит последовательность нуклеотидов (от 5'-конца к 3'-концу) 1-17, 2-17, 1-18, 2-18,

15 1-19, 2-19, 1-20, 2-20, 1-21, 2-21, 1-22, 2-22, 1-23, 2-23, 1-24 или 2-24 любой из последовательностей, указанных в таблице 2, таблице 3 или таблице 5.4. В некоторых вариантах антисмысловая цепь агента РНКи DUX4 содержит или состоит из модифицированной последовательности любой из модифицированных последовательностей, указанных в таблице 3.

20 В некоторых вариантах смысловая цепь агента РНКи DUX4 содержит любую нуклеотидную последовательность, указанную в таблице 2 или таблицах 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 или 5.4. В некоторых вариантах смысловая цепь агента РНКи DUX4 содержит последовательность нуклеотидов (от 5'-конца к 3'-концу) 1-17, 2-17, 3-17, 4-17, 1-18, 2-18, 3-18, 4-18, 1-19, 2-19, 3-19, 4-19, 1-20, 2-20, 3-

25 20, 4-20, 1-21, 2-21, 3-21, 4-21, 1-22, 2-22, 3-22, 4-22, 1-23, 2-23, 3-23, 4-23, 1-24, 2-24, 3-24 или 4-24 любой из последовательностей, указанных в таблице 2 или таблицах 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 или 5.4. В некоторых вариантах смысловая цепь агента РНКи DUX4 содержит или состоит из модифицированной последовательности любой из модифицированных последовательностей,

30 указанных в таблицах 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 или 5.4.

В агентах РНКи DUX4, раскрытых в данном контексте, нуклеотид в положении 1 антисмысловой цепи (от 5'-конца к 3'-концу) может являться полностью комплементарным гену *DUX4* или может являться некомплементарным гену *DUX4*. В некоторых вариантах нуклеотид в положении

1 антисмысловой цепи (от 5'-конца к 3'-концу) представляет собой U, A или dT (или их модифицированные варианты). В некоторых вариантах нуклеотид в положении 1 антисмысловой цепи (от 5'-конца к 3'-концу) образует пару оснований A:U или U:A со смысловой цепью.

5 В некоторых вариантах антисмысловая цепь агента РНКи DUX4 содержит последовательность нуклеотидов (от 5'-конца к 3'-концу) 2-18 или 2-19 любой из последовательностей антисмысловой цепи, указанных в таблице 2 или таблице 3. В некоторых вариантах смысловая цепь агента РНКи DUX4 содержит последовательность нуклеотидов (от 5'-конца к 3'-концу) 1-17 или 1-18 любой из
10 последовательностей смысловой цепи, указанных в таблице 2 или в таблицах 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 или 5.4.

В некоторых вариантах агент РНКи DUX4 включает (i) антисмысловую цепь, содержащую последовательность нуклеотидов (от 5'-конца к 3'-концу) 2-18 или 2-19 любой из последовательностей антисмысловой цепи, указанных в
15 таблице 2 или таблице 3, и (ii) смысловую цепь, содержащую последовательность нуклеотидов (от 5'-конца к 3'-концу) 1-17 или 1-18 любой из последовательностей смысловой цепи, указанных в таблице 2 или таблицах 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 или 5.4.

Смысловую цепь, содержащую последовательность, указанную в таблице 2
20 или таблице 4, можно гибридизовать с любой антисмысловой цепью, содержащей последовательность, указанную в таблице 2 или таблице 3, при условии, что две последовательности характеризуются наличием области, по меньшей мере с 85%-ой комплементарностью в отношении непрерывной последовательности из 16, 17, 18, 19, 20 или 21 нуклеотидов. В некоторых
25 вариантах агент РНКи DUX4 характеризуется наличием смысловой цепи, состоящей из модифицированной последовательности любой из модифицированных последовательностей, представленных в таблицах 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 или 5.4, и антисмысловую цепь, состоящую из модифицированных последовательностей любой из модифицированных
30 последовательностей, указанных в таблице 3 или таблице 5.4. Некоторые типичные пары последовательностей иллюстрируются идентификационными номерами дуплексов, указанными в таблицах 5.1, 5.2, 5.3 и 5.4.

В некоторых вариантах агент РНКи DUX4 содержит, состоит из или в основном состоит из дуплекса, обозначенного любым из ID-номеров дуплекса,

представленных в данном контексте. В некоторых вариантах агент РНКи DUX4 содержит нуклеотидные последовательности смысловой цепи и антисмысловой цепи любого из дуплексов, обозначенных любым из идентификационных номеров дуплексов, представленных в данном контексте. В некоторых вариантах агент РНКи DUX4 содержит нуклеотидные последовательности смысловой цепи и антисмысловой цепи любого из дуплексов, обозначенных любыми идентификационными номерами дуплексов, представленных в данном контексте, и направляющий лиганд, направляющую группу и/или связывающую группу, где направляющий лиганд, направляющая группа и/или связывающая группа ковалентно присоединена (т.е. конъюгирована) к смысловой цепи или антисмысловой цепи. В некоторых вариантах агент РНКи DUX4 включает модифицированные нуклеотидные последовательности смысловой и антисмысловой цепи любого из представленных идентификационными номерами дуплексов в данном контексте. В некоторых вариантах агент РНКи DUX4 содержит модифицированные нуклеотидные последовательности смысловой и антисмысловой цепи любого из представленных в данном контексте идентификационными номерами дуплексов, а также направляющий лиганд, направляющую группу и/или связывающую группу, где направляющий лиганд, направляющая группа, и/или связывающая группа ковалентно присоединены к смысловой цепи или антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах агент РНКи DUX4 содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, характеризующиеся наличием нуклеотидных последовательностей любого из дуплексов антисмысловой/смысловой цепей, указанных в таблице 2 или таблице 5.1 (или таблице 5.2, таблице 5.3 или таблице 5.4), а также включает направляющую группу. В некоторых вариантах агент РНКи DUX4 содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, характеризующиеся наличием нуклеотидных последовательностей любого из дуплексов антисмысловой/смысловой цепей, указанных в таблице 5.1 (или в таблице 5.2, таблице 5.3 или таблице 5.4), и дополнительно содержит группу, направляющую на лиганд интегринового рецептора.

В некоторых вариантах агент РНКи DUX4 содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, характеризующиеся наличием нуклеотидных последовательностей любого из дуплексов антисмысловая цепь/смысловая цепь, указанных в таблицах 5.1, 5.2, 5.3 или 5.4, и содержит одну или более

связывающих групп, выбранных из группы, состоящей из (NH₂-C₆), (C₆-NH₂), (C₆-SS-C₆) или (6-SS-6), каждая из которых определена в таблице 6.1.

В некоторых вариантах агент РНКи DUX4 содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, характеризующуюся наличием модифицированной нуклеотидной последовательности, любой из последовательностей нуклеотидов антисмысловой цепи и/или смысловой цепи, указанных в таблице 3 или в таблицах 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 или 5.4.

В некоторых вариантах агент РНКи DUX4 содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, характеризующуюся наличием модифицированной нуклеотидной последовательности, любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи и/или смысловой цепи любого из дуплексов, указанных в таблице 5.1 (или в таблице 5.2, 5.3 или 5.4) и дополнительно содержит группу, направленную на интегрин.

В некоторых вариантах агент РНКи DUX4 содержит, состоит из или в основном состоит из любого из дуплексов, указанных в таблице 5.1 (или в таблицах 5.2, 5.3 или 5.4).

Таблица 5.1

Дуплексы агентов РНКи DUX4 с соответствующими идентификационными номерами смысловой и антисмысловой цепей.

ID дуплекса	ID антисмысловой цепи	ID смысловой цепи
AD07218	AM09247-AS	AM09965-SS
AD07219	AM09250-AS	AM09966-SS
AD07220	AM09252-AS	AM09967-SS
AD07221	AM09260-AS	AM09968-SS
AD07274	AM10029-AS	AM09965-SS
AD07275	AM10030-AS	AM09966-SS
AD07276	AM10026-AS	AM09967-SS
AD07277	AM10028-AS	AM09968-SS
AD07394	AM10009-AS	AM10194-SS
AD07395	AM10195-AS	AM10194-SS
AD07396	AM10019-AS	AM10196-SS
AD07397	AM10197-AS	AM10196-SS
AD07398	AM10023-AS	AM10198-SS
AD07399	AM10199-AS	AM10198-SS
AD07510	AM10252-AS	AM09967-SS
AD07511	AM10378-AS	AM09967-SS
AD07512	AM10380-AS	AM10379-SS
AD07513	AM10381-AS	AM10379-SS

ID дуплекса	ID антисмысловой цепи	ID смысловой цепи
AD07514	AM10380-AS	AM10382-SS
AD07515	AM10381-AS	AM10382-SS
AD07555	AM10159-AS	AM10463-SS
AD07556	AM10464-AS	AM10463-SS
AD07557	AM09250-AS	AM10465-SS
AD07558	AM10030-AS	AM10465-SS
AD07615	AM10564-AS	AM10463-SS
AD07616	AM10565-AS	AM10463-SS
AD07617	AM10566-AS	AM10463-SS
AD07618	AM10567-AS	AM10463-SS
AD07619	AM10464-AS	AM10568-SS
AD07620	AM10464-AS	AM10569-SS
AD07662	AM10260-AS	AM09968-SS
AD07663	AM10645-AS	AM09968-SS
AD07664	AM10251-AS	AM09967-SS
AD07665	AM10646-AS	AM09967-SS
AD07666	AM10647-AS	AM10379-SS
AD07667	AM10648-AS	AM10379-SS
AD07775	AM10850-AS	AM09965-SS
AD07776	AM10851-AS	AM09965-SS
AD07777	AM10852-AS	AM09965-SS
AD07778	AM10853-AS	AM09965-SS
AD07779	AM09247-AS	AM10854-SS
AD07780	AM10029-AS	AM10854-SS
AD07843	AM10948-AS	AM09967-SS
AD07844	AM10949-AS	AM09967-SS
AD07845	AM10949-AS	AM10950-SS

Таблица 5.2

Дуплексы агента РНКи DUX4 с соответствующими идентификационными номерами смысловых и антисмысловых цепей и идентификационными номерами последовательностей для модифицированных и немодифицированных нуклеотидных последовательностей.

Дуплекс	ID антисмысло- вой цепи (АЦ)	АЦ модифи- циро- ванная SEQ ID NO:	АЦ немоди- фициро- ванная SEQ ID NO:	ID смысловой цепи (СЦ)	СЦ модифи- циро- ванная SEQ ID NO*:	СЦ немоди- фициро- ванная SEQ ID NO:
AD07218	AM09247-AS	66	162	AM09965-SS	117	181
AD07219	AM09250-AS	67	163	AM09966-SS	118	182
AD07220	AM09252-AS	68	164	AM09967-SS	119	183

Дуплекс	ID антисмысло- вой цепи (АЦ)	АЦ модифи- циро- ванная SEQ ID NO:	АЦ немоди- фициро- ванная SEQ ID NO:	ID смысловой цепи (СЦ)	СЦ модифи- циро- ванная SEQ ID NO*:	СЦ немоди- фициро- ванная SEQ ID NO:
AD07221	AM09260-AS	69	165	AM09968-SS	120	184
AD07274	AM10029-AS	75	162	AM09965-SS	117	181
AD07275	AM10030-AS	76	163	AM09966-SS	118	182
AD07276	AM10026-AS	73	164	AM09967-SS	119	183
AD07277	AM10028-AS	74	165	AM09968-SS	120	184
AD07394	AM10009-AS	70	166	AM10194-SS	121	185
AD07395	AM10195-AS	78	166	AM10194-SS	121	185
AD07396	AM10019-AS	71	167	AM10196-SS	122	186
AD07397	AM10197-AS	79	167	AM10196-SS	122	186
AD07398	AM10023-AS	72	168	AM10198-SS	123	187
AD07399	AM10199-AS	80	168	AM10198-SS	123	187
AD07510	AM10252-AS	82	164	AM09967-SS	119	183
AD07511	AM10378-AS	84	164	AM09967-SS	119	183
AD07512	AM10380-AS	85	170	AM10379-SS	124	188
AD07513	AM10381-AS	86	170	AM10379-SS	124	188
AD07514	AM10380-AS	85	170	AM10382-SS	125	188
AD07515	AM10381-AS	86	170	AM10382-SS	125	188
AD07555	AM10159-AS	77	169	AM10463-SS	126	189
AD07556	AM10464-AS	87	169	AM10463-SS	126	189
AD07557	AM09250-AS	67	163	AM10465-SS	127	239
AD07558	AM10030-AS	76	163	AM10465-SS	127	239
AD07615	AM10564-AS	88	169	AM10463-SS	126	189
AD07616	AM10565-AS	89	169	AM10463-SS	126	189
AD07617	AM10566-AS	90	169	AM10463-SS	126	189
AD07618	AM10567-AS	91	169	AM10463-SS	126	189
AD07619	AM10464-AS	87	169	AM10568-SS	128	189
AD07620	AM10464-AS	87	169	AM10569-SS	129	189
AD07662	AM10260-AS	83	165	AM09968-SS	120	184
AD07663	AM10645-AS	92	165	AM09968-SS	120	184
AD07664	AM10251-AS	81	164	AM09967-SS	119	183
AD07665	AM10646-AS	93	164	AM09967-SS	119	183
AD07666	AM10647-AS	94	170	AM10379-SS	124	188
AD07667	AM10648-AS	95	170	AM10379-SS	124	188
AD07775	AM10850-AS	96	162	AM09965-SS	117	181
AD07776	AM10851-AS	97	162	AM09965-SS	117	181

Дуплекс	ID антисмысло- вой цепи (АЦ)	АЦ модифи- циро- ванная SEQ ID NO:	АЦ немоди- фициро- ванная SEQ ID NO:	ID смысловой цепи (СЦ)	СЦ модифи- циро- ванная SEQ ID NO*:	СЦ немоди- фициро- ванная SEQ ID NO:
AD07777	AM10852-AS	98	162	AM09965-SS	117	181
AD07778	AM10853-AS	99	162	AM09965-SS	117	181
AD07779	AM09247-AS	66	162	AM10854-SS	130	190
AD07780	AM10029-AS	75	162	AM10854-SS	130	190
AD07843	AM10948-AS	100	164	AM09967-SS	119	183
AD07844	AM10949-AS	101	164	AM09967-SS	119	183
AD07845	AM10949-AS	101	164	AM10950-SS	131	183

* Модифицированная последовательность СЦ взята из таблицы 4.2 (показана без добавления терминального dT нуклеотида с целью технологичности).

Таблица 5.3

- 5 Дуплексы агентов РНКи DUX4 с соответствующими идентификационными номерами смысловой и антисмысловой цепей, с указанием положения, направленного на ген *DUX4*.

ID дуплекса	ID антисмысловой цепи	ID смысловой цепи	Положение XHD гена- мишени (в соответствии с SEQ ID NO:1)
AD07218	AM09247-AS	AM09965-SS	408
AD07219	AM09250-AS	AM09966-SS	409
AD07220	AM09252-AS	AM09967-SS	1437
AD07221	AM09260-AS	AM09968-SS	1518
AD07274	AM10029-AS	AM09965-SS	408
AD07275	AM10030-AS	AM09966-SS	409
AD07276	AM10026-AS	AM09967-SS	1437
AD07277	AM10028-AS	AM09968-SS	1518
AD07394	AM10009-AS	AM10194-SS	1433
AD07395	AM10195-AS	AM10194-SS	1433
AD07396	AM10019-AS	AM10196-SS	1496
AD07397	AM10197-AS	AM10196-SS	1496
AD07398	AM10023-AS	AM10198-SS	1522
AD07399	AM10199-AS	AM10198-SS	1522
AD07510	AM10252-AS	AM09967-SS	1437
AD07511	AM10378-AS	AM09967-SS	1437
AD07512	AM10380-AS	AM10379-SS	1437
AD07513	AM10381-AS	AM10379-SS	1437
AD07514	AM10380-AS	AM10382-SS	1437
AD07515	AM10381-AS	AM10382-SS	1437
AD07555	AM10159-AS	AM10463-SS	409

ID дуплекса	ID антисмысловой цепи	ID смысловой цепи	Положение XHD гена-мишени (в соответствии с SEQ ID NO:1)
AD07556	AM10464-AS	AM10463-SS	409
AD07557	AM09250-AS	AM10465-SS	409
AD07558	AM10030-AS	AM10465-SS	409
AD07615	AM10564-AS	AM10463-SS	409
AD07616	AM10565-AS	AM10463-SS	409
AD07617	AM10566-AS	AM10463-SS	409
AD07618	AM10567-AS	AM10463-SS	409
AD07619	AM10464-AS	AM10568-SS	409
AD07620	AM10464-AS	AM10569-SS	409
AD07662	AM10260-AS	AM09968-SS	1518
AD07663	AM10645-AS	AM09968-SS	1518
AD07664	AM10251-AS	AM09967-SS	1437
AD07665	AM10646-AS	AM09967-SS	1437
AD07666	AM10647-AS	AM10379-SS	1437
AD07667	AM10648-AS	AM10379-SS	1437
AD07775	AM10850-AS	AM09965-SS	408
AD07776	AM10851-AS	AM09965-SS	408
AD07777	AM10852-AS	AM09965-SS	408
AD07778	AM10853-AS	AM09965-SS	408
AD07779	AM09247-AS	AM10854-SS	408
AD07780	AM10029-AS	AM10854-SS	408
AD07843	AM10948-AS	AM09967-SS	1437
AD07844	AM10949-AS	AM09967-SS	1437
AD07845	AM10949-AS	AM10950-SS	1437

Как описано в данном контексте, в некоторых вариантах осуществления изобретения дуплексная нуклеотидная последовательность смысловой цепи и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи могут быть

- 5 присоединены к определенными направляющими лигандами и/или модуляторами ФК/ФД. Некоторые типичные направляющие лиганды и/или модуляторы ФК/ФД присоединены, как показано в следующей таблице 5.4, которая демонстрирует полностью конъюгированные дуплексы, имеющие идентификационный префикс «АС».

Таблица 5.4

Идентификационные номера конъюгатов с химически модифицированными антисмысловыми и смысловыми цепями (включая линкеры и конъюгаты).

AC ID номер	Цепь (SS = смысловая цепь AS = антисмысловая цепь)	Цепь (полностью модифицированная с конъюгированным направляющим лигандом) (5' → 3')	Полностью конъюгированный вариант дуплекса AD, ID номер
AC000232	SS	$\alpha\text{v}\beta\text{6-SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)scuguucuuCfCfGfugaaaauucas(inv Ab)(C6-S)-LP1b}$ (SEQ ID NO:221)	AD07511
	AS	cPrpusAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacag (SEQ ID NO:84)	
AC000237	SS	$\alpha\text{v}\beta\text{6-SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)scaggauucAfGfAfucugguuucas(inv Ab)(C6-S)-LP1b}$ (SEQ ID NO:222)	AD07776
	AS	cPrpusGfsasaaccagauCfuGfaAfuccug (SEQ ID NO:97)	
AC000246	SS	$\alpha\text{v}\beta\text{6-pep1-(NH-C6)s(inv Ab)scuguucuuCfCfGfugaaaauucas(inv Ab)(C6-S)-LP38b}$ (SEQ ID NO:223)	AD07511
	AS	cPrpusAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacag (SEQ ID NO:84)	
AC000247	SS	$\alpha\text{v}\beta\text{6-pep1-(NH-C6)s(inv Ab)scaggauucAfGfAfucugguuucas(inv Ab)(C6-S)-LP38b}$ (SEQ ID NO:224)	AD07776
	AS	cPrpusGfsasaaccagauCfuGfaAfuccug (SEQ ID NO:97)	
AC000250	SS	$\alpha\text{v}\beta\text{6-SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)scuguucuuCfCfGfugaaaauucas(inv Ab)(C6-S)-LP1b}$ (SEQ ID NO:221)	AD07220
	AS	usAfsGfsAfaUfuUfcAfcGfgAfaGfaAfcAfsG (SEQ ID NO:68)	
AC000251	SS	$\alpha\text{v}\beta\text{6-SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)scaggauucAfGfAfucugguuucas(inv Ab)(C6-S)-LP1b}$ (SEQ ID NO:222)	AD07218
	AS	usGfsasAfaCfcAfuCfuGfaAfuCfcUfsG (SEQ ID NO:66)	

AC ID номер	Цепь (SS = смысловая цепь AS = антисмысловая цепь)	Цепь (полностью модифицированная с конъюгированным направляющим лигандом) (5' → 3')	Полностью конъюгиро- ванный вариант дуплекса AD, ID номер
AC000252	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)saggauucaGfAfUfcugguucaas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:225)	AD07219
	AS	usUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsu (SEQ ID NO:67)	
AC000253	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)saggauucaGfAfUfcugguucaas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:225)	AD07275
	AS	cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsu (SEQ ID NO:76)	
AC000254	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)scuguucuuCfCfGfugaaauucas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:221)	AD07276
	AS	cPrpusAfsgsAfaUfuUfcAfcGfgAfaGfaAfcAfsg (SEQ ID NO:73)	
AC000255	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)succuggauGfAfUfuaguucagaas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:226)	AD07221
	AS	usUfscsUfgAfaCfuAfaUfcAfuCfcAfgGfsa (SEQ ID NO:69)	
AC000256	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)succuggauGfAfUfuaguucagaas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:226)	AD07277
	AS	cPrpusUfscsUfgAfaCfuAfaUfcAfuCfcAfgGfsa (SEQ ID NO:74)	
AC000257	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)sa_2NaaccuggAfUfUfagaguucacaus(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:227)	AD07396
	AS	asUfsgsUfaAfcUfcUfaAfuCfcAfgGfuUfsu (SEQ ID NO:71)	
AC000258	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)scuguucuuCfCfGfugaaauucas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:221)	AD07276
	AS	cPrpusAfsgsAfaUfuUfcAfcGfgAfaGfaAfcAfsg (SEQ ID NO:73)	
AC000259	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)scuguucuuCfCfGfugaaauucas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:221)	AD07510

AC ID номер	Цепь (SS = смысловая цепь AS = антисмысловая цепь)	Цепь (полностью модифицированная с конъюгированным направляющим лигандом) (5' → 3')	Полностью конъюгиро- ванный вариант дуплекса AD, ID номер
	AS	usAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:82)	
AC000260	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)sguguucuuCfCfGfugaaaauucuas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:228)	AD07512
	AS	usAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasc (SEQ ID NO:85)	
AC000261	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)sguguucuuCfCfGfugaaaauucuas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:228)	AD07513
	AS	cPrpusAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasc (SEQ ID NO:86)	
AC000262	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)sguguucUfuCfCfGfugaaaauucuas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:229)	AD07514
	AS	usAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasc (SEQ ID NO:85)	
AC000263	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)sguguucUfuCfCfGfugaaaauucuas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:229)	AD07515
	AS	cPrpusAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasc (SEQ ID NO:86)	
AC000264	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)sgcccuuguUfCfUfuccgugaaaus(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:230)	AD07394
	AS	asUfsusUfcAfcGfgAfaGfaAfcAfaGfgGfsc (SEQ ID NO:70)	
AC000265	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)sgcccuuguUfCfUfuccgugaaaus(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:230)	AD07395
	AS	cPrpasUfsusUfcAfcGfgAfaGfaAfcAfaGfgGfsc (SEQ ID NO:78)	
AC000266	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)sggaugauuAfGfUfucagagauaus(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:231)	AD07398
	AS	asUfsasUfcUfcUfgAfaCfuAfaUfcAfuCfsc (SEQ ID NO:72)	

AC ID номер	Цепь (SS = смысловая цепь AS = антисмысловая цепь)	Цепь (полностью модифицированная с конъюгированным направляющим лигандом) (5' → 3')	Полностью конъюгиро- ванный вариант дуплекса AD, ID номер
AC000267	SS	$\alpha\text{v}\beta 6\text{-SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)sggauuuAfGfUfucagagauaus(inv Ab)(C6-S)-LP1b}$ (SEQ ID NO:231)	AD07399
	AS	cPrpasUfsasUfcUfcUfgAfaCfuAfaUfcAfuCfsc (SEQ ID NO:80)	
AC000268	SS	$\alpha\text{v}\beta 6\text{-SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)sgggauucaGfAfUfcugguuucass(inv Ab)(C6-S)-LP1b}$ (SEQ ID NO:232)	AD07555
	AS	usUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsc (SEQ ID NO:77)	
AC000269	SS	$\alpha\text{v}\beta 6\text{-SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)sgggauucaGfAfUfcugguuucass(inv Ab)(C6-S)-LP1b}$ (SEQ ID NO:232)	AD07556
	AS	cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsc (SEQ ID NO:87)	
AC000270	SS	$\alpha\text{v}\beta 6\text{-SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)sa_2NggauucaGfAfUfcugguuucass(inv Ab)(C6-S)-LP1b}$ (SEQ ID NO:244)	AD07557
	AS	usUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsu (SEQ ID NO:67)	
AC000271	SS	$\alpha\text{v}\beta 6\text{-SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)sa_2NggauucaGfAfUfcugguuucass(inv Ab)(C6-S)-LP1b}$ (SEQ ID NO:245)	AD07558
	AS	cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsu (SEQ ID NO:76)	
AC000272	SS	$\alpha\text{v}\beta 6\text{-SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)sgggauucaGfAfUfcugguuucass(inv Ab)(C6-S)-LP1b}$ (SEQ ID NO:232)	AD07615
	AS	usUfsgsaaaccagaUfcUfgAfauccsc (SEQ ID NO:88)	
AC000273	SS	$\alpha\text{v}\beta 6\text{-SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)sgggauucaGfAfUfcugguuucass(inv Ab)(C6-S)-LP1b}$ (SEQ ID NO:232)	AD07616
	AS	cPrpusUfsgsaaaccagaUfcUfgAfauccsc (SEQ ID NO:89)	
AC000274	SS	$\alpha\text{v}\beta 6\text{-SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)sgggauucaGfAfUfcugguuucass(inv Ab)(C6-S)-LP1b}$ (SEQ ID NO:232)	AD07617

AC ID номер	Цепь (SS = смысловая цепь AS = антисмысловая цепь)	Цепь (полностью модифицированная с конъюгированным направляющим лигандом) (5' → 3')	Полностью конъюгиро- ванный вариант дуплекса AD, ID номер
	AS	usUfsgsaaacCfaGfaUfcUfgAfauccsc (SEQ ID NO:90)	
AC000275	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)sgggauucaGfAfUfcugguuucas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:232)	AD07618
	AS	cPrpusUfsgsaaacCfaGfaUfcUfgAfauccsc (SEQ ID NO:91)	
AC000276	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)sgggauucaGfaUfcugguuucas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:233)	AD07619
	AS	cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsc (SEQ ID NO:87)	
AC000277	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)sgggauucaGfaUfcUfgugguuucas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:234)	AD07620
	AS	cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsc (SEQ ID NO:87)	
AC000278	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)scaggauucAfGfAfucugguuucas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:222)	AD07274
	AS	cPrpusGfsasAfaCfcAfgAfuCfuGfaAfuCfcUfsg (SEQ ID NO:75)	
AC000279	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)scaggauucAfGfAfucugguuucas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:222)	AD07775
	AS	usGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:96)	
AC000280	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)scaggauucAfGfAfucugguuucas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:222)	AD07777
	AS	usGfsasAfaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:98)	
AC000281	SS	$\alpha\text{v}\beta 6$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)scaggauucAfGfAfucugguuucas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:222)	AD07778
	AS	cPrpusGfsasAfaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:99)	

AC ID номер	Цепь (SS = смысловая цепь AS = антисмысловая цепь)	Цепь (полностью модифицированная с конъюгированным направляющим лигандом) (5' → 3')	Полностью конъюгиро- ванный вариант дуплекса AD, ID номер
AC000282	SS	$\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)scuguucuuCfCfGfugaaaauucas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:221)	AD07843
	AS	cPrpusAfsGsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:100)	
AC000283	SS	$\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -SM45-L4-(NH-C6)s(inv Ab)scuguucuuCfCfGfugaaaauucas(inv Ab)(C6-S)-LP1b (SEQ ID NO:221)	AD07844
	AS	cPrpusAfsGfsaauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:101)	
AC000446	SS	$\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -peptide 1-(NH-C6)s(inv Ab)scuguucuuCfCfGfugaaaauucas(inv Ab)(C6-S)-LP29b (SEQ ID NO:235)	AD07511
	AS	cPrpusAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:84)	
AC000447	SS	$\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -peptide 1-(NH-C6)s(inv Ab)scaggauucAfGfAfucugguuucas(inv Ab)(C6-S)-LP29b (SEQ ID NO:236)	AD07776
	AS	cPrpusGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:97)	
AC000448	SS	$\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -peptide 1-(NH-C6)s(inv Ab)scaggauucAfGfAfucugguuucas(inv Ab)(C6-S)-LP29b (SEQ ID NO:236)	AD07778
	AS	cPrpusGfsasAfaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:99)	
AC000449	SS	$\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -peptide 1-(NH-C6)s(inv Ab)scaggauucAfGfAfucugguuucas(inv Ab)(C6-S)-LP38b (SEQ ID NO:237)	AD07778
	AS	cPrpusGfsasAfaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:99)	

В некоторых вариантах агент РНКи DUX4 готовят или предоставляют в виде соли, смешанной соли, свободной кислоты или свободного основания. В некоторых вариантах агент РНКи XDN получают в виде фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах агент РНКи XDN получают в виде фармацевтически приемлемой натриевой соли. Такие формы, которые хорошо известны в данной области техники, включены в объем раскрытых в данном контексте изобретений. Агенты РНКи, описанные в данном контексте, при доставке в клетку, экспрессирующую ген *DUX4*, ингибируют или подавляют (нокдаун) экспрессию одного или более генов *DUX4 in vivo* и/или *in vitro*.

В некоторых вариантах в данном контексте описаны композиции, которые включают комбинацию или коктейль из по меньшей мере из двух агентов РНКи DUX4 с разными последовательностями. В некоторых вариантах каждый из двух или более агентов РНКи DUX4 отдельно и независимо связан с направляющими группами. В некоторых вариантах каждый из двух или более агентов РНКи DUX4 связан с направляющими группами, которые включают или состоят из направляющих лигандов. В некоторых вариантах каждый из двух или более агентов РНКи DUX4 связан с направляющими группами.

Направляющие группы, связывающие группы и носители для доставки

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент РНКи DUX4 содержит или конъюгирован с одной или более нуклеотидными группами, включая, но не ограниваясь только ими, направляющую группу, связывающую группу, фармакокинетический/фармакодинамический (ФК/ФД) модулятор, полимер для доставки или носитель для доставки. Нуклеотидная группа может ускорять направление, доставку или присоединение агента РНКи. Примеры связывающих групп представлены в таблице 6.1, а примеры направляющих групп или направляющих лигандов представлены в таблицах 6.2 и 6.3.

Нуклеотидная группа может быть ковалентно присоединена к 3'- и/или 5'-концу либо смысловой цепи, либо антисмысловой цепи. В некоторых вариантах агент РНКи DUX4 содержит нуклеотидную группу, связанную с 3'- и/или 5'-концом смысловой цепи. В некоторых вариантах нуклеотидная группа связана с 5'-концом смысловой цепи агента РНКи DUX4. Нуклеотидная группа может быть связана непосредственно или опосредованно с агентом РНКи через линкер/связывающую группу. В некоторых вариантах нуклеотидная группа

связана с агентом РНКи через лабильную, расщепляемую или обратимую связь или линкер.

В некоторых вариантах ненуклеотидная группа усиливает фармакокинетические или биораспределительные свойства агента РНКи или конъюгата, к которому она присоединена, для улучшения клеточного или тканеспецифического распределения и клеточно-специфического захвата конъюгата. В некоторых вариантах ненуклеотидная группа усиливает эндоцитоз агента РНКи.

Направляющие группы или направляющие лиганды улучшают фармакокинетические или биораспределительные свойства конъюгата или агента РНКи, к которым они присоединены, для улучшения клеточно-специфического (включая в некоторых случаях органоспецифического) распределения и клеточно-специфического (или органоспецифического) захвата конъюгата или агента РНКи. Направляющая группа может являться одновалентной, двухвалентной, трехвалентной, четырехвалентной или характеризоваться более высокой валентностью по отношению к мишени, на которую она направлена. Типичные направляющие группы включают, но не ограничиваясь только ими, соединения со сродством к молекуле клеточной поверхности, лиганды клеточных рецепторов, гаптены, антитела, моноклональные антитела, фрагменты антител и миметики антител со сродством к молекулам клеточной поверхности. В некоторых вариантах направляющая группа связана с агентом РНКи через линкер, такой как линкер ПЭГ или один, два или три остатка нуклеотида с удаленным азотистым основанием и/или рибитола (рибозы с удаленным азотистым основанием), которые в некоторых случаях могут служить линкерами.

Агенты РНКи DUX4, описанные в данном контексте, можно синтезировать при включении реакционноспособной группы, такой как аминогруппа (также называемая здесь амином), на 5'-конце и/или на 3'-конце. Реакционноспособную группу можно использовать впоследствии для присоединения направляющего фрагмента с использованием способов, известных в данной области техники.

Например, в некоторых вариантах агенты РНКи DUX4, раскрытые в данном контексте, синтезированы при включении группы NH₂-C₆ (представленной как (NH₂-C₆) в модифицированных последовательностях в данном контексте) на 5'-конце смысловой цепи агента РНКи. Концевая аминогруппа впоследствии может

взаимодействовать с образованием конъюгата, например, с группой, которая включает направляющий лиганд. В некоторых вариантах агенты РНКи DUX4, раскрытые в данном контексте, синтезируют при включении одной или более алкиновых групп на 5'-конце смысловой цепи агента РНКи. Концевая(ые) алкиновая(ые) группа(ы) впоследствии может прореагировать с образованием конъюгата, например, с группой, которая включает направляющий лиганд.

В некоторых вариантах агенты РНКи содержат направляющую группу, которая включает два или более направляющих лиганда. В некоторых вариантах направляющая группа является конъюгированной по 5'- или по 3'-концу смысловой цепи агента РНКи. В некоторых вариантах направляющая группа является конъюгированной с внутренним нуклеотидом агента РНКи. В некоторых вариантах направляющая группа может состоять из двух связанных вместе направляющих лигандов, называемых «бидентатной» направляющей группой. В некоторых вариантах направляющая группа может состоять из трех связанных вместе направляющих лигандов, называемых «тридентатной» направляющей группой. В некоторых вариантах направляющая группа может состоять из четырех связанных вместе направляющих лигандов, называемых «тетрадентатной» направляющей группой.

В некоторых вариантах применение направляющего лиганда ускоряет клеточно-специфическое направление на клетки-мишени, характеризующиеся наличием необходимых рецепторов на своей поверхности, а связывание направляющего лиганда может способствовать проникновению терапевтического агента, такого как агент РНКи, с которым он связан, в клетки, такие как клетки скелетных мышц. Направляющие лиганды могут являться мономерными или моновалентными (например, включать один направляющий фрагмент) или мультимерными или поливалентными (например, включать несколько направляющих фрагментов). Направляющую группу можно присоединить к 3'- и/или 5'-концу олигонуклеотида РНКи с использованием методов, известных в данной области техники.

Варианты осуществления настоящего изобретения включают фармацевтические композиции для доставки агента РНКи DUX4 в клетку скелетных мышц *in vivo*. Такие фармацевтические композиции могут включать, например, агент РНКи DUX4, конъюгированный с направляющей группой, которая содержит направляющий лиганд.

В некоторых вариантах агенты РНКи DUX4, описанные в данном контексте, могут снижать экспрессию гена DUX4 в одной или более следующих тканей: параспинальной, лицевой, туловищной, брюшной и мышечной ткани конечностей, включая, например, трицепс, бицепс, четырехглавую мышцу, грудную мышцу, икроножную мышцу, камбаловидную мышцу, жевательную мышцу, EDL (длинный разгибатель пальцев), ТА (передняя большеберцовая мышца), трапециевидную мышцу и/или диафрагму.

В некоторых вариантах связывающая группа конъюгирована с агентом РНКи. Связывающая группа ускоряет ковалентное связывание агента с направляющей группой, фармакокинетическим модулятором, полимером для доставки или с носителем для доставки. Связывающая группа может являться связанной с 3'- и/или 5'-концом смысловой цепи или антисмысловой цепи агента РНКи. В некоторых вариантах связывающая группа связана со смысловой цепью агента РНКи. В некоторых вариантах связывающая группа конъюгирована с 5'- или 3'-концом смысловой цепи агента РНКи. В некоторых вариантах связывающая группа конъюгирована с 5'-концом смысловой цепи агента РНКи. Примеры связывающих групп включают, но не ограничиваясь только ими: С6-SS-С6, 6-SS-6, реакционноспособные группы, такие как первичные амины (например, NH₂-С6) и алкины, алкильные группы, нуклеотиды с удаленным азотистым основанием, аминокислоты, триалкиновые функционализированные группы, рибитольные и/или ПЭГ-группы.

Линкер или связывающая группа представляет собой соединение между двумя атомами, которое связывает одну химическую группу (такую как агент РНКи) или исследуемый сегмент с другой химической группой (такой как направляющая группа, фармакокинетический модулятор или полимер для доставки) или исследуемый сегмент через одну или более ковалентных связей. Лабильное соединение содержит лабильную связь. Связь может необязательно включать спейсер, который увеличивает расстояние между двумя соединенными атомами. Спейсер может дополнительно увеличить гибкость и/или длину связи. Спейсеры включают, но не ограничиваются ими, алкильные группы, алкенильные группы, алкинильные группы, арильные группы, аралкильные группы, аралкенильные группы и аралкинильные группы, каждая из которых может содержать один или более гетероатомов, гетероциклов, аминокислот, нуклеотидов и сахаридов. Спейсерные группы хорошо известны в данной

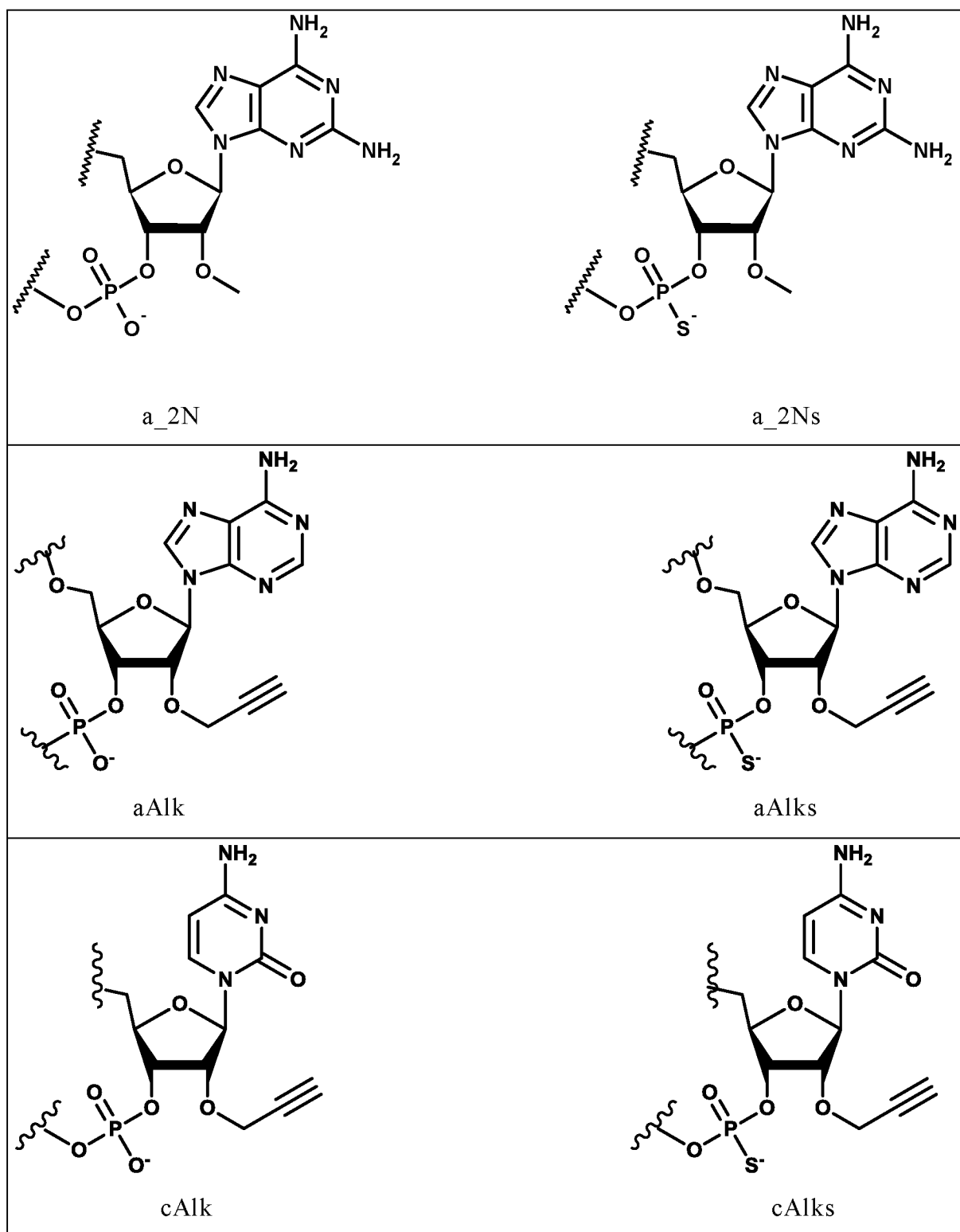
области техники, и приведенный выше список не ограничивает объем настоящего изобретения.

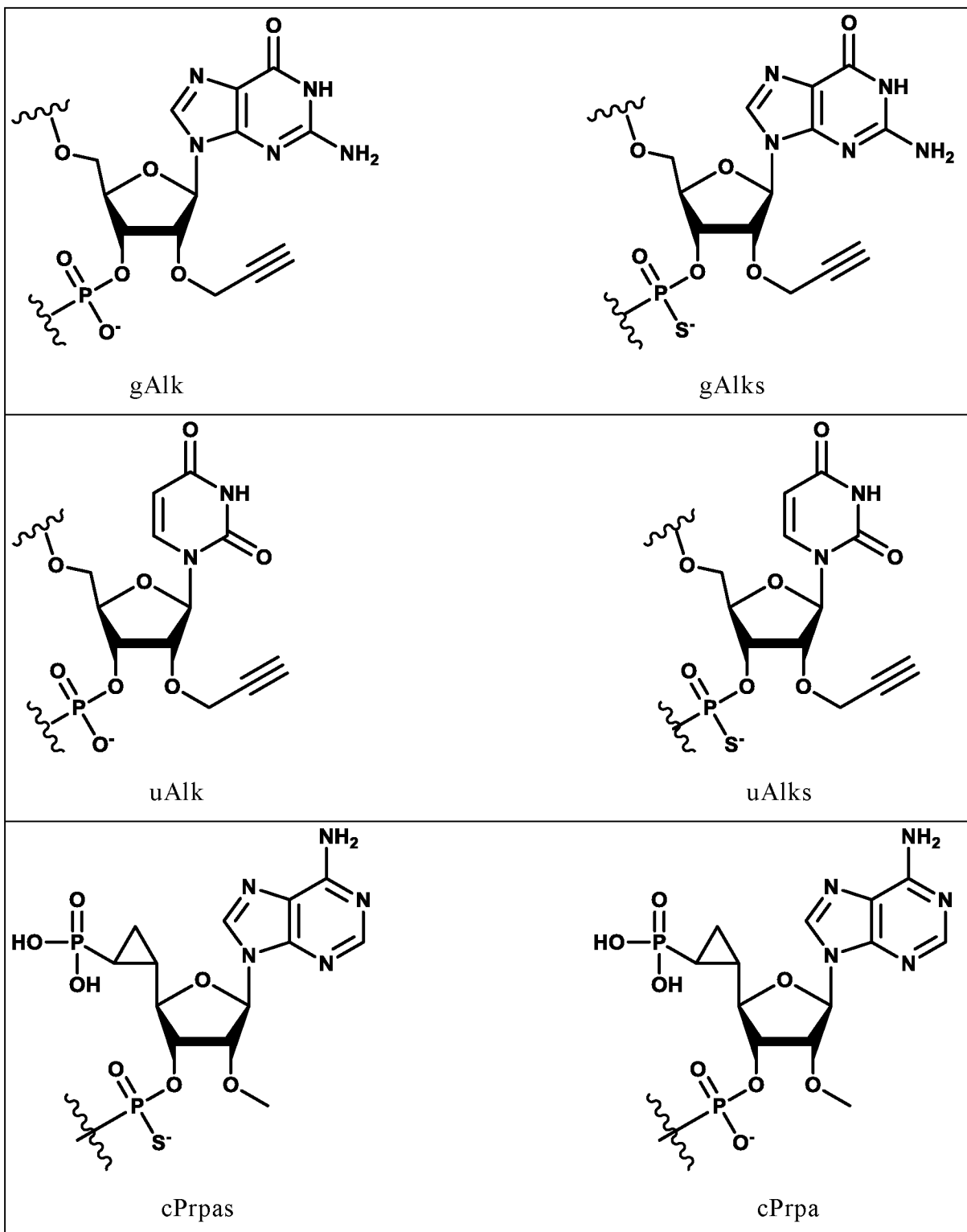
В некоторых вариантах направляющие группы связаны с агентами РНКи DUX4 без использования дополнительного линкера. В некоторых вариантах направляющая группа соединена с легко доступным линкером для ускорения связывания с агентом РНКи DUX4. В некоторых вариантах, когда два или более агента РНКи включены в композицию, два или более агента РНКи могут быть присоединены к соответствующим направляющим группам с использованием одних и тех же линкеров. В некоторых вариантах, когда два или более агента РНКи включены в композицию, два или более агента РНКи присоединены к их соответствующим направляющим группам с использованием разных линкеров.

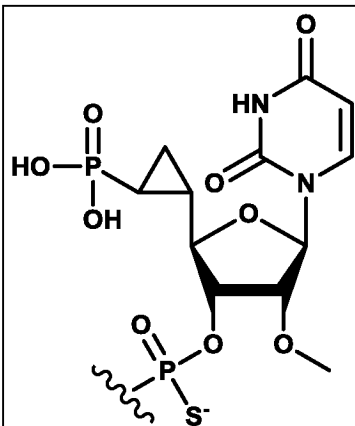
Любая из нуклеотидных последовательностей агента РНКи DUX4, перечисленных в таблицах 2, 3, а также 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 и 5.4, модифицированная или немодифицированная, может содержать 3'- и/или 5'-направляющую группу (группы), связывающую группу(ы) и/или фармакокинетический модулятор(ы). Любая из последовательностей агента РНКи DUX4, перечисленных в таблицах 3, а также 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 и 5.4, или иным образом описанных в данном контексте, которые содержат 3'- или 5'-направляющую группу, связывающую группу или фармакокинетический модулятор, может, наоборот, не содержать 3'- или 5'-направляющую группу, связывающую группу или модулятор ФК/ФД или может содержать другую 3'- или 5'-направляющую группу, связывающую группу или модулятор ФК/ФД, включая, но не ограничиваясь только ими, изображенные в таблицах 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6 или 6.7. Любой из дуплексов агента РНКи DUX4, представленных в таблице 5.1 (или в таблицах 5.2, 5.3 или 5.4), модифицированный или немодифицированный, может дополнительно содержать направляющую группу, связывающую группу или модулятор ФК/ФД, включая, но не ограничиваясь только ими, изображенные в таблицах 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6 или 6.7, и в некоторых вариантах направляющая группа, связывающая группа и/или модулятор ФК/ФД могут являться присоединенными к 3'- или 5'-концу смысловой цепи или антисмысловой цепи дуплекса агента РНКи DUX4.

Таблица 6.1

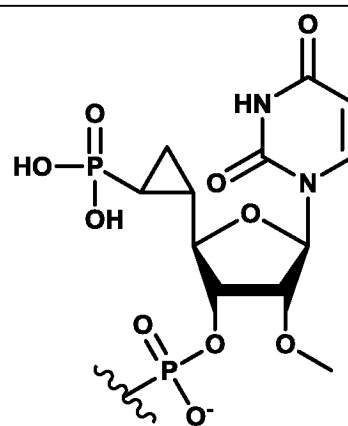
Структуры различных модифицированных нуклеотидов и связывающих групп.







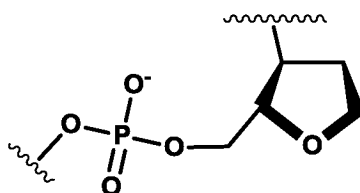
cPrpus



cPrpu

При внутреннем расположении:

связь к 5'-концу

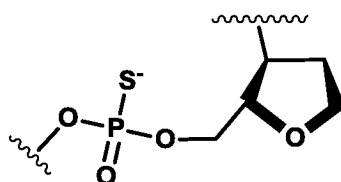


связь к 3'-концу

(invAb)

При внутреннем расположении:

связь к 5'-концу

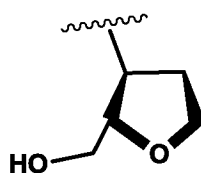


связь к 3'-концу

(invAb)s

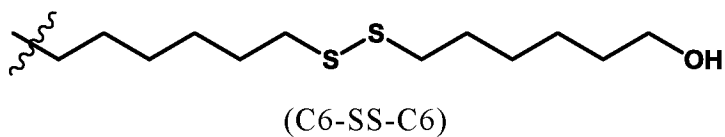
При расположении на 3'-конце:

связь к 5' концу



(invAb)

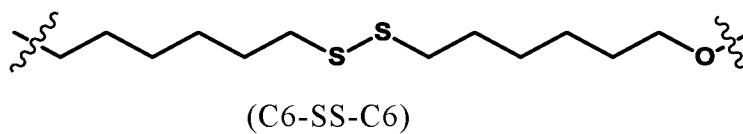
При расположении на 3'-конце олигонуклеотида:



При внутреннем расположении:

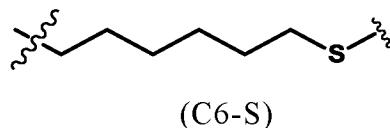
связь к 5'-концу
олигонуклеотида

связь к 3'-концу
олигонуклеотида

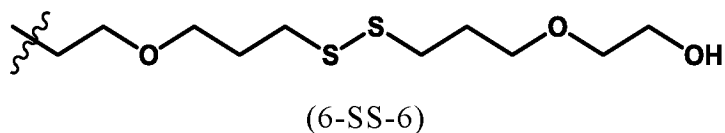


связь к 5'-концу
олигонуклеотида

связь к 3'-концу
олигонуклеотида



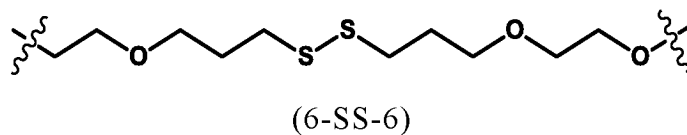
При расположении на 3'-конце:

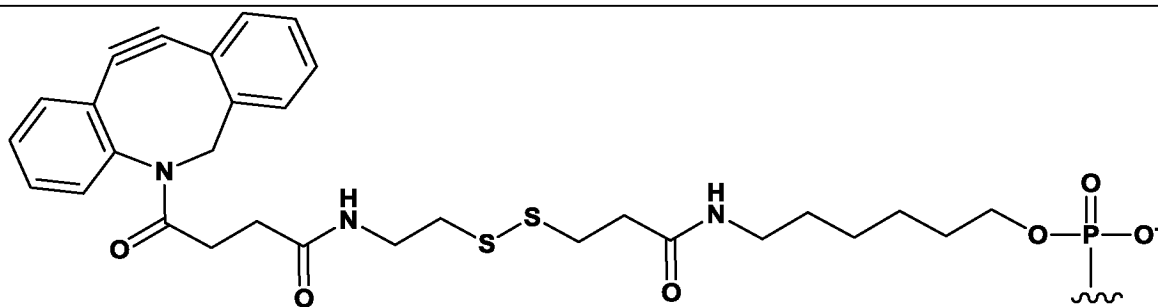


При расположении внутри олигонуклеотида:

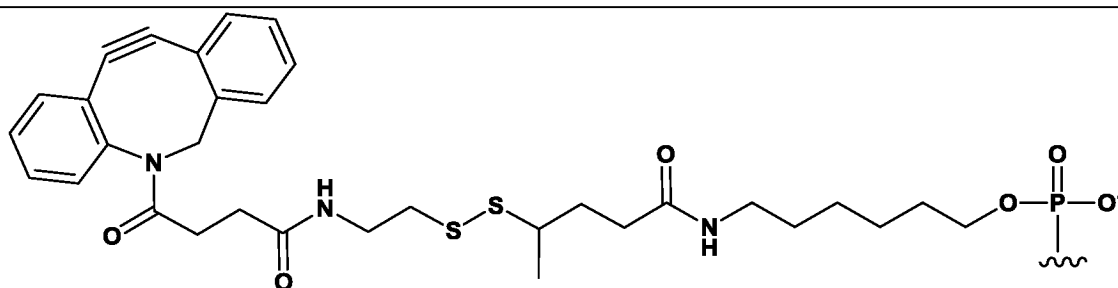
связь к 5'-концу
олигонуклеотида

связь к 3'-концу
олигонуклеотида

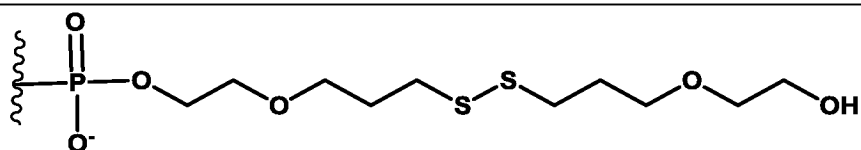




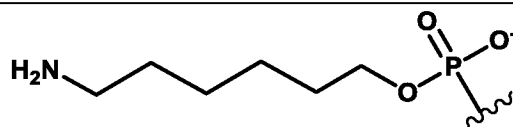
(C6-SS-Alk) or (Alk-SS-C6)



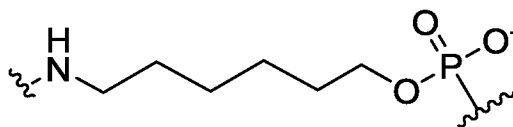
(C6-SS-Alk-Me)



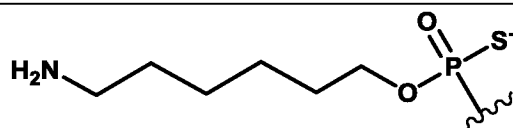
(ΠЭГ-C3-SS)



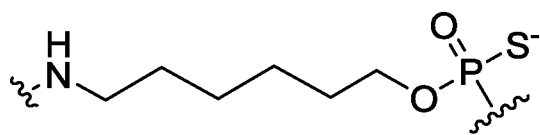
(NH2-C6)



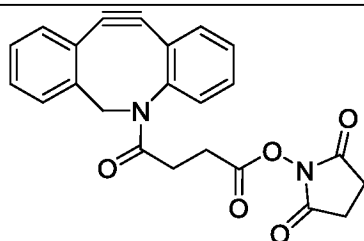
(NH-C6)



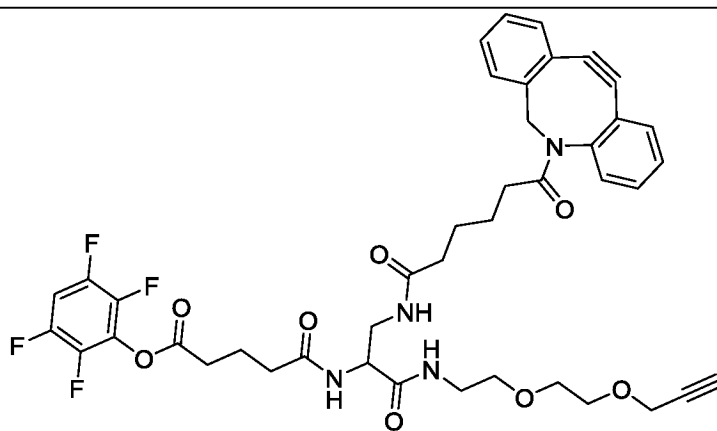
(NH2-C6)s



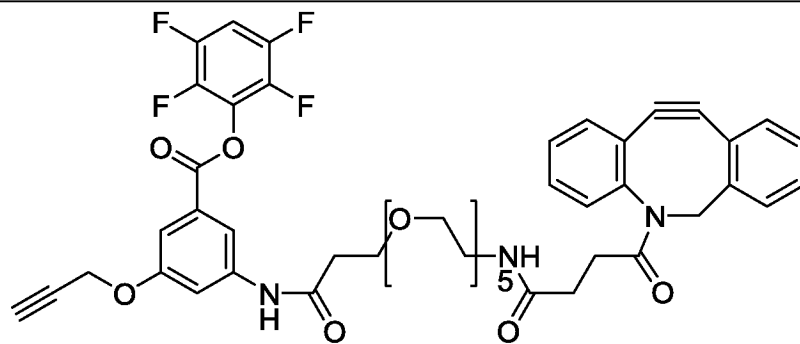
(NH-C6)s



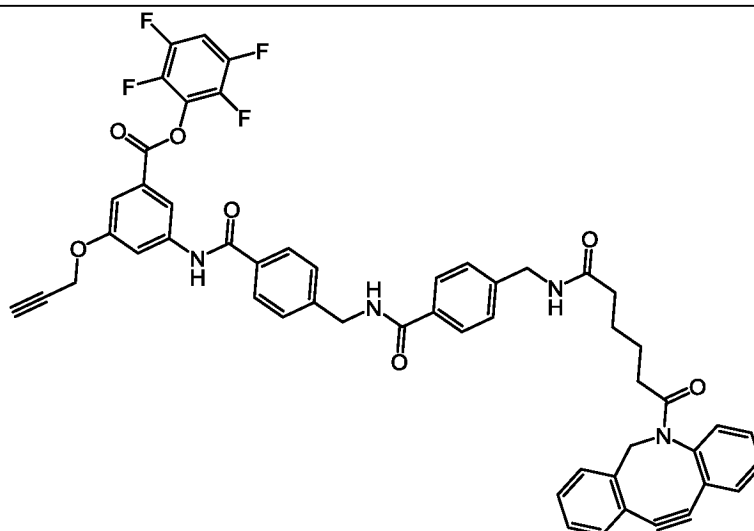
DBCO-NHS (BroadPharm® BP-22231)



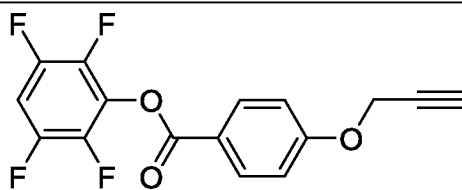
Линкер-1



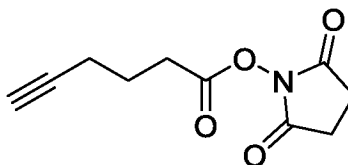
Линкер-2



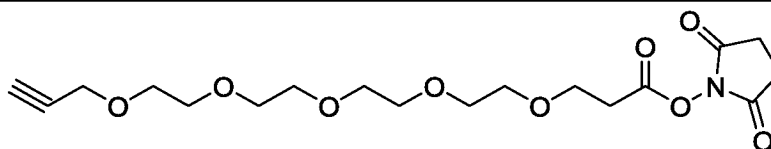
Линкер-3



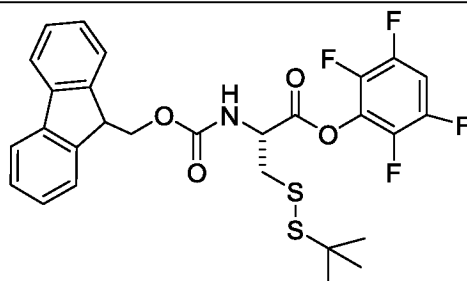
Линкер-4



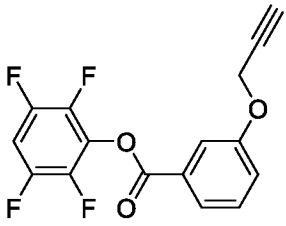
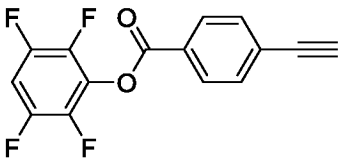
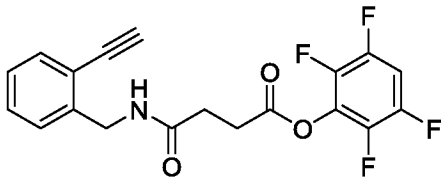
Линкер-5 (Activate Scientific® AS28942)



Линкер-6 (BroadPharm® BP-20907)



Линкер-7

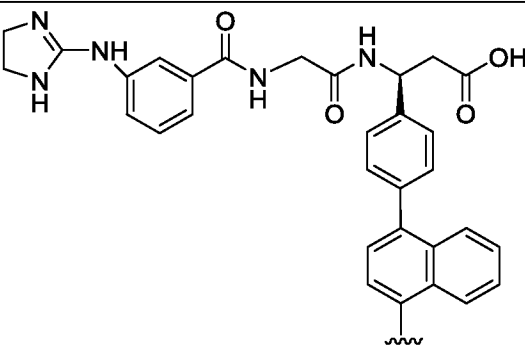
 Линкер-8
 Линкер-9
 Линкер-10

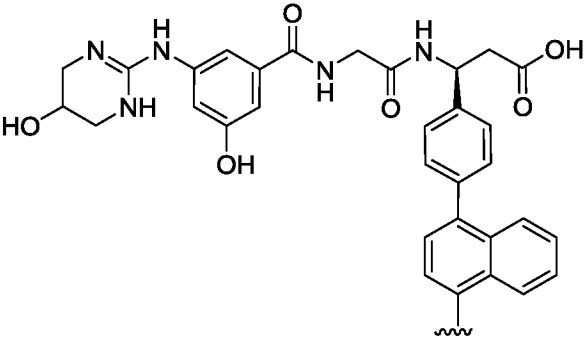
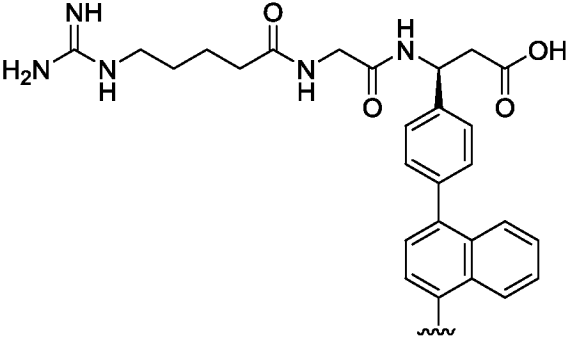
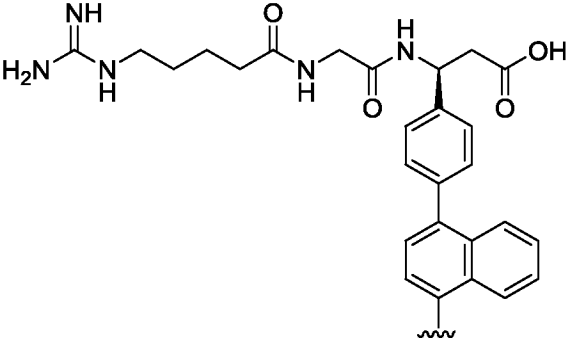
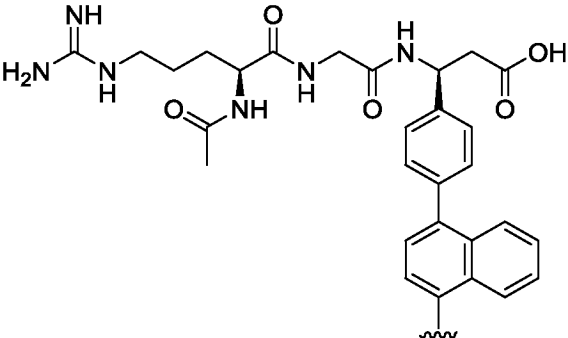
В другом варианте можно использовать другие линкерные группы, известные в данной области техники. Во многих случаях связывающие группы, которые выпускаются на соответствующей фирме, или же они могут быть включены в выпускаемые фирмами нуклеотидные фосфорамидиты.

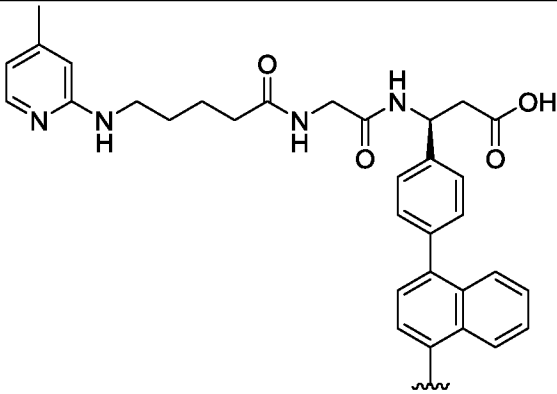
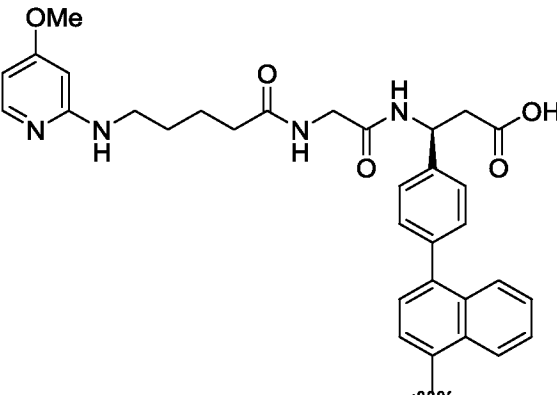
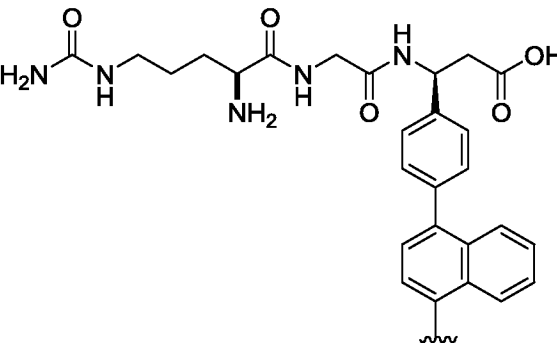
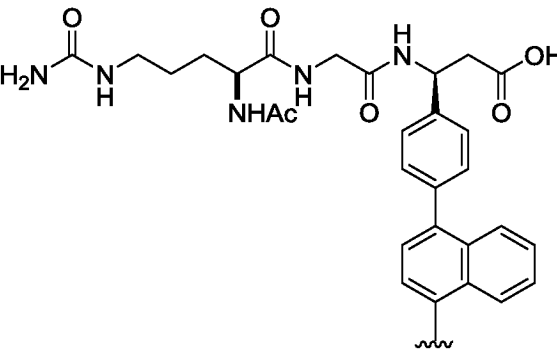
В некоторых вариантах направляющий лиганд связан с агентами РНКи DUX4, раскрытыми в данном контексте. Примеры некоторых направляющих лигандов представлены в таблице 6.2.

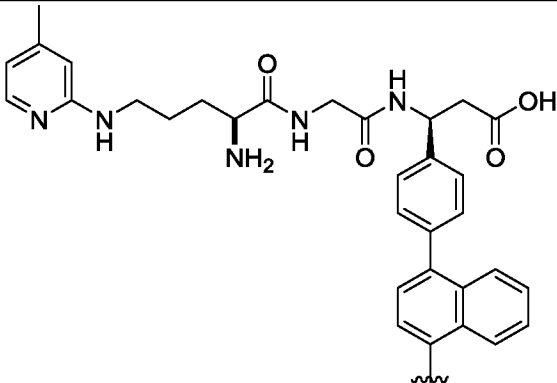
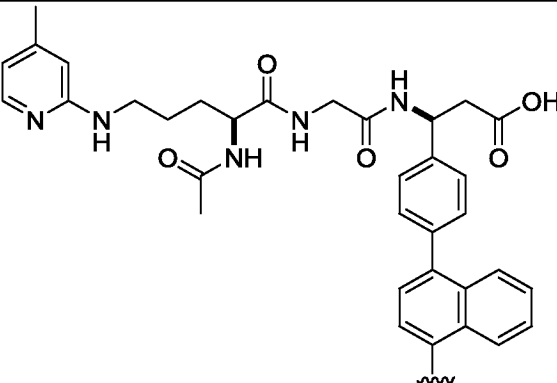
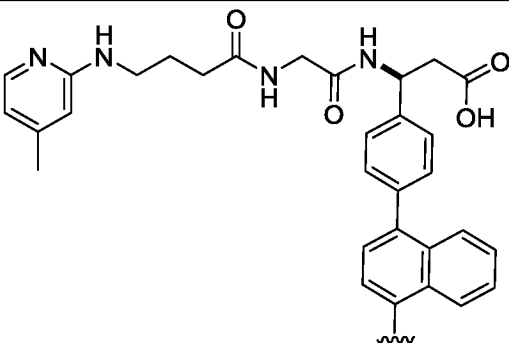
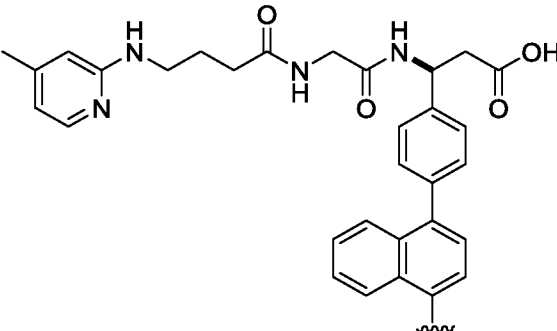
Таблица 6.2

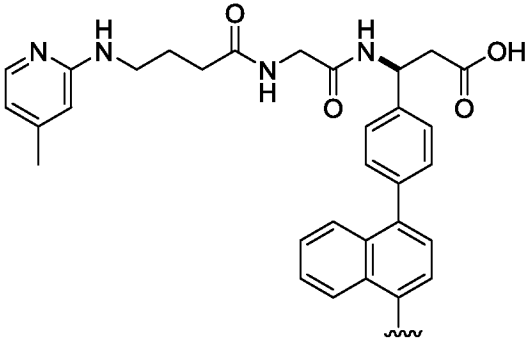
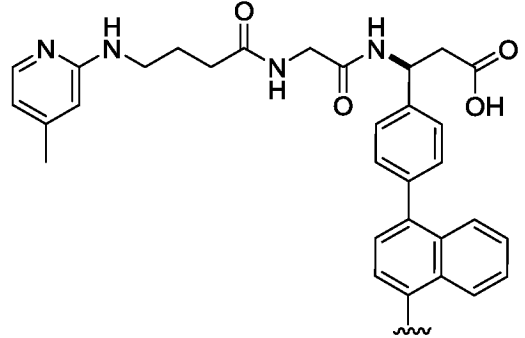
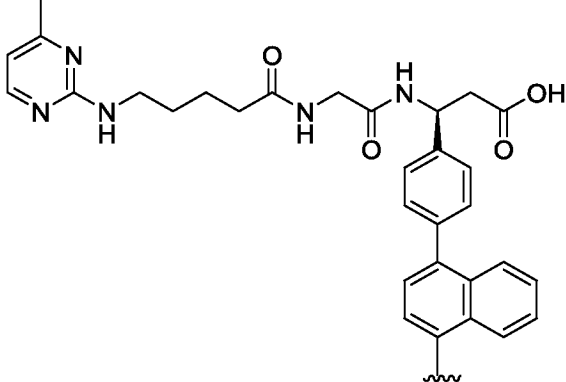
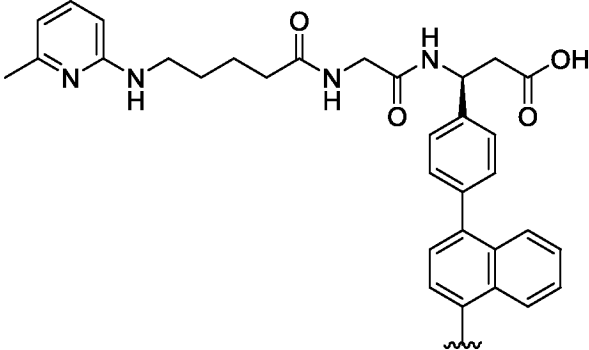
Структуры, представляющие направляющие лиганды.

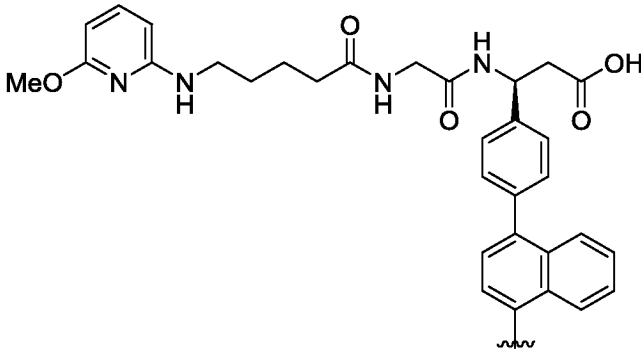
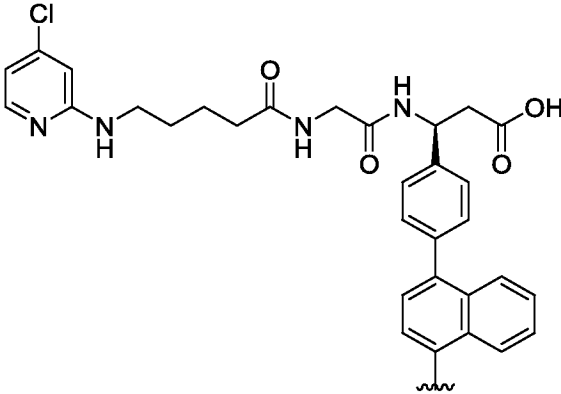
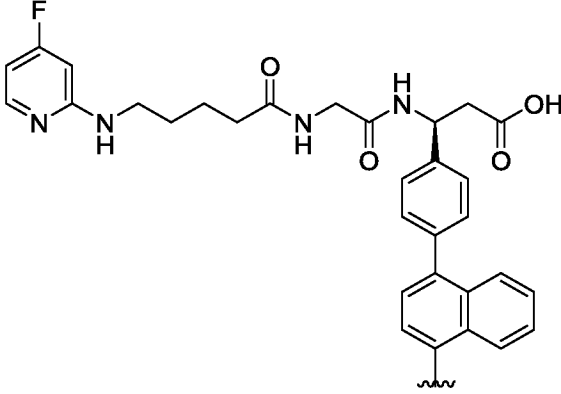
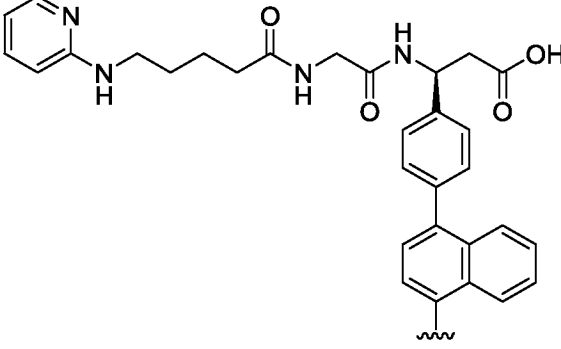
Номер соединения	Формула
SM40a	

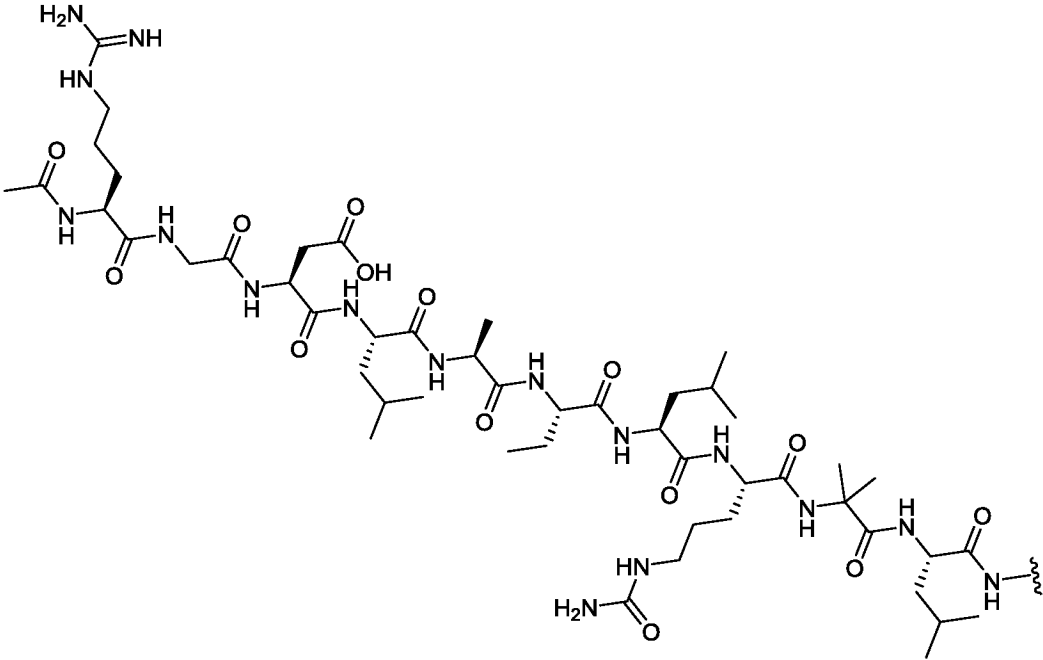
Номер соединения	Формула
SM41a	
SM42a	
SM43a	
SM44a	

Номер соединения	Формула
SM45a	
SM46a	
SM47a	
SM48a	

Номер соединения	Формула
SM49a	
SM50a	
SM51a	
SM52a	

Номер соединения	Формула
SM53a	
SM54a	
SM55a	
SM56a	

Номер соединения	Формула
SM57a	 <chem>COc1ccc(NCCCCC(=O)NCC(=O)N[C@@H](Cc2ccc(cc2-c3ccccc3)C4=CC=CC=C4)CC(=O)O)cc1</chem>
SM58a	 <chem>Clc1ccc(NCCCCC(=O)NCC(=O)N[C@@H](Cc2ccc(cc2-c3ccccc3)C4=CC=CC=C4)CC(=O)O)cc1</chem>
SM59a	 <chem>Fc1ccc(NCCCCC(=O)NCC(=O)N[C@@H](Cc2ccc(cc2-c3ccccc3)C4=CC=CC=C4)CC(=O)O)cc1</chem>
SM60a	 <chem>c1ccc(NCCCCC(=O)NCC(=O)N[C@@H](Cc2ccc(cc2-c3ccccc3)C4=CC=CC=C4)CC(=O)O)cc1</chem>

Номер соединения	Формула
Пептид 1a	

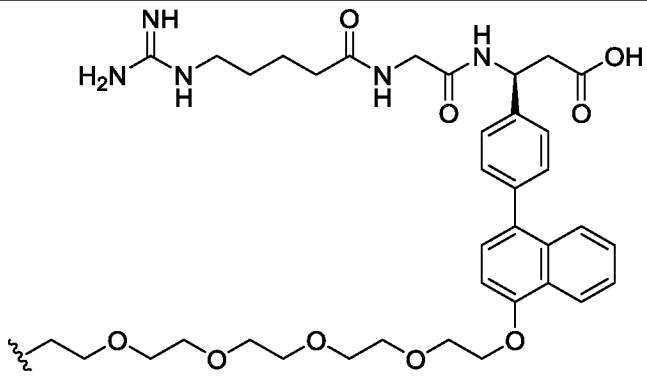
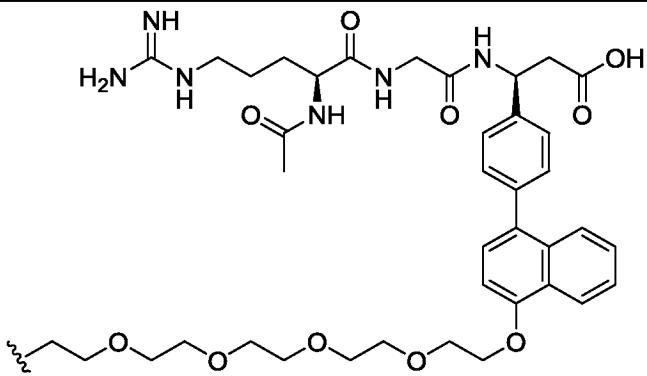
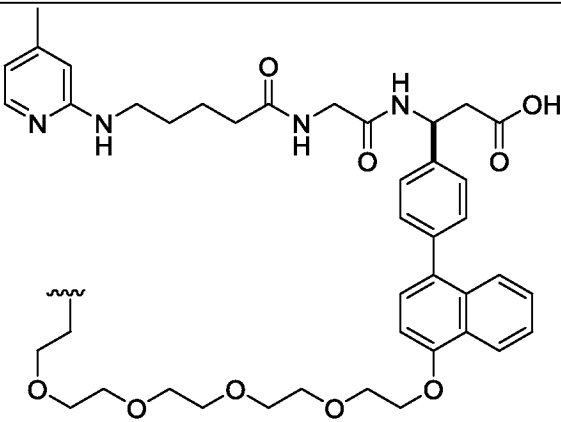
или их фармацевтически приемлемые соли, где элемент  указывает на место присоединения к агентам РНКи DUX4. В некоторых вариантах ПЭГ или другая связывающая группа включена между агентом РНКи и направляющим лигандом.

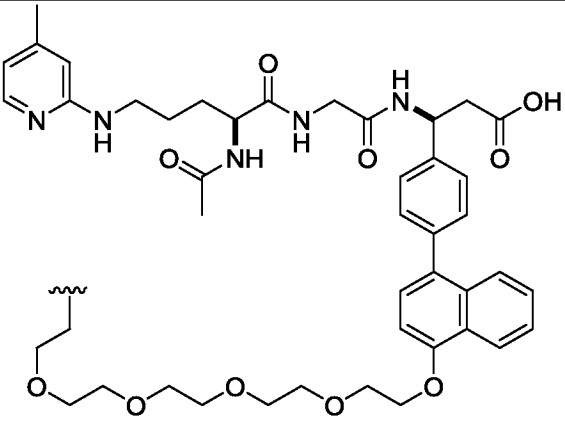
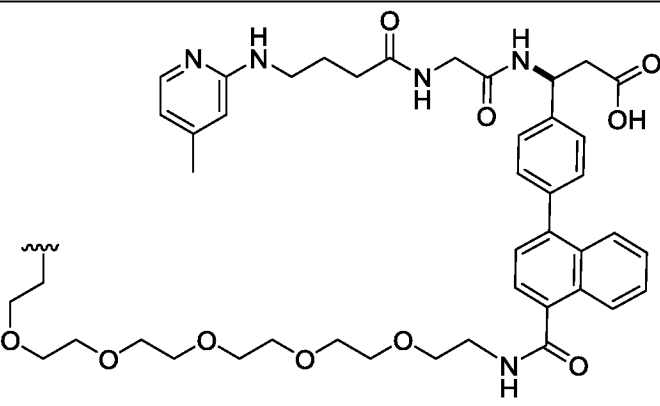
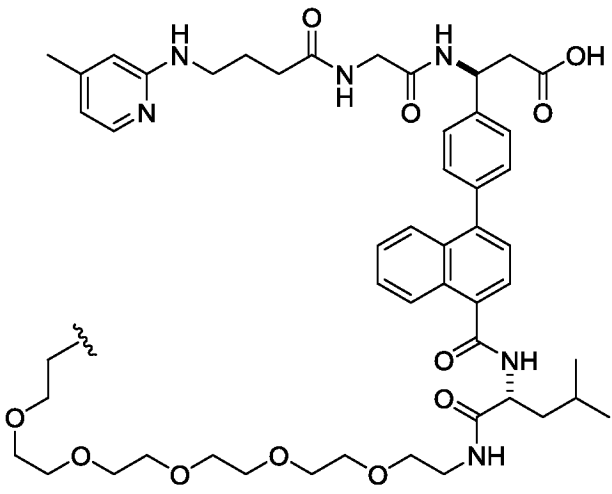
- 5 В некоторых вариантах направляющие группы в таблице 6.2 синтезированы с включенными реакционноспособными группами, позволяющими эффективно связывать направляющий лиганд, который включает одну или более направляющих групп, с агентами РНКи, раскрытыми в данном контексте. В некоторых вариантах направляющие группы, указанные в таблице 6.2,
- 10 синтезируют в виде азидов для ускорения связывания с агентом РНКи.

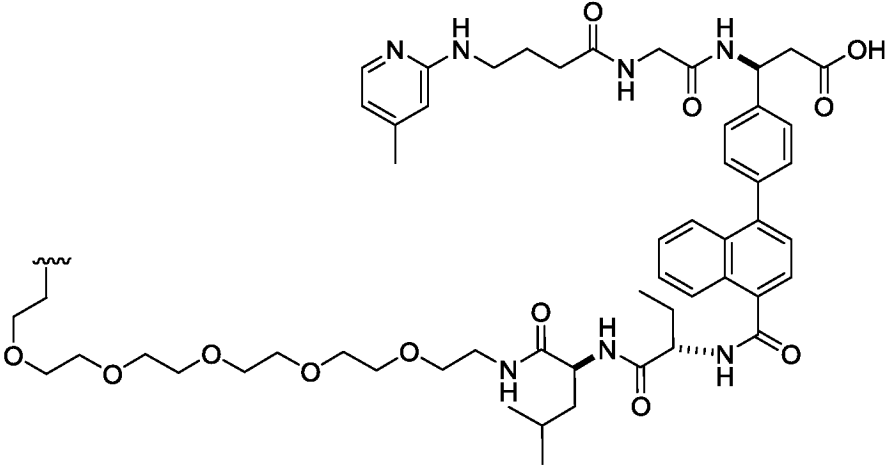
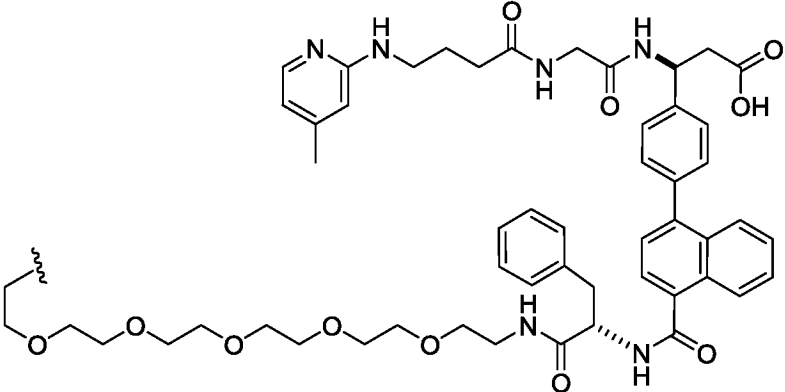
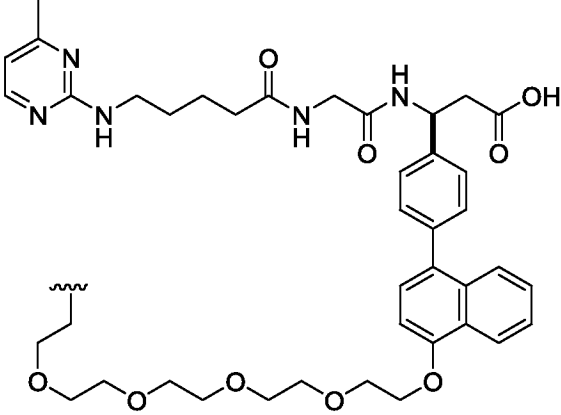
В некоторых вариантах агенты РНКи DUX4 связаны с направляющим лигандом, который характеризуется структурой, раскрытой в таблице 6.3.

Таблица 6.3

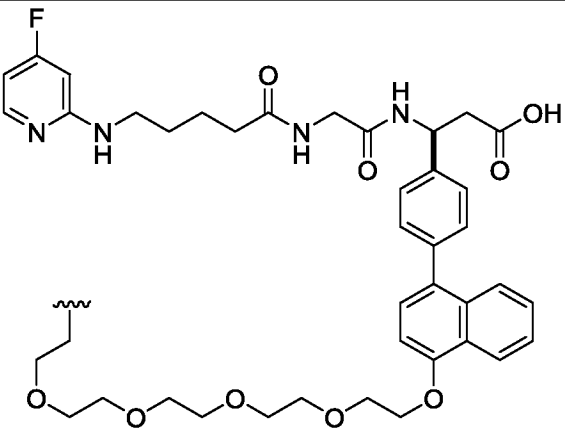
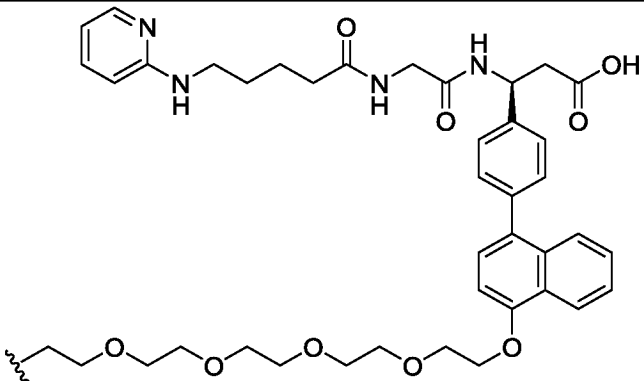
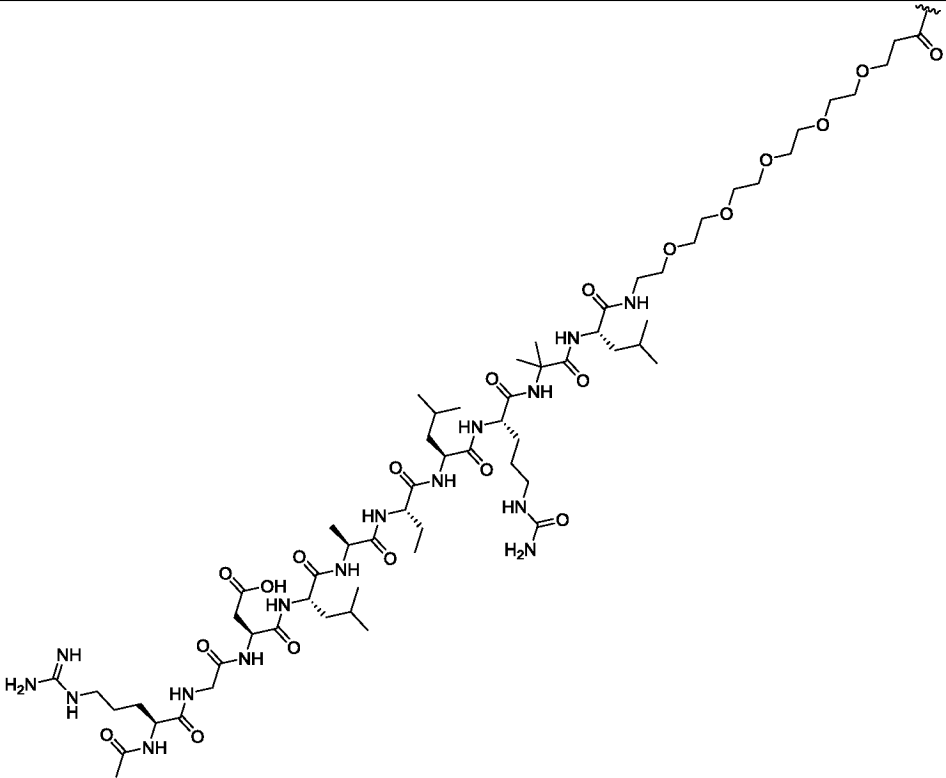
Примеры направляющих лигандов для комбинации с агентами РНКи DUX4

Номер соединения	Формула
43b	
44b	
45b	

Номер соединения	Формула
50b	 Chemical structure of compound 50b: A molecule featuring a 4-methylpyridine ring connected via an amine group to a chain containing a chiral center, an amide, and a carboxylic acid group. This chain is further connected to a biphenyl system, which is linked to a long polyether chain (HO-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-OH) via an ether linkage.
51b	 Chemical structure of compound 51b: A molecule featuring a 4-methylpyridine ring connected via an amine group to a chain containing a chiral center, an amide, and a carboxylic acid group. This chain is further connected to a biphenyl system, which is linked to a long polyether chain (HO-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-OH) via an amide linkage.
52b	 Chemical structure of compound 52b: A molecule featuring a 4-methylpyridine ring connected via an amine group to a chain containing a chiral center, an amide, and a carboxylic acid group. This chain is further connected to a biphenyl system, which is linked to a long polyether chain (HO-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-OH) via an amide linkage.

Номер соединения	Формула
53b	
54b	
55b	

Номер соединения	Формула
56b	
57b	
58b	

Номер соединения	Формула
59b	
60b	
$\alpha\text{v}\beta\text{6}$ Пептид 1	

или их фармацевтически приемлемых солей, где элемент R^1 указывает на место присоединения к агентам РНКи DUX4.

В некоторых вариантах носитель для доставки можно использовать для доставки агента РНКи в клетку или ткань. Носитель для доставки представляет собой соединение, улучшающее доставку агента РНКи в клетку или ткань. Средство для доставки может включать или состоять из полимера, такого как амфипатический полимер, мембраноактивный полимер, пептид, пептид мелиттин, пептид, подобный мелиттину (MLP), липид, обратимо модифицированный полимер или пептид, или обратимо модифицированный мембраноактивный полиамин.

В некоторых вариантах агенты РНКи можно комбинировать с липидами, наночастицами, полимерами, липосомами, мицеллами, DPC или другими системами доставки, доступными в данной области техники для доставки нуклеиновых кислот. Агенты РНКи также можно химически конъюгировать с направляющими группами, липидами (включая, но не ограничиваясь только ими, холестерин и производные холестерина), инкапсулировать в наночастицы, липосомы, мицеллы, конъюгировать с полимерами или DPC (см., например, патентные заявки WO 2000/053722, WO 2008/022309, WO 2011/104169 и WO 2012/083185, WO 2013/032829, WO 2013/158141, каждая из которых включена в настоящий документ в качестве ссылки), с использованием ионтофореза или включения в другие носители или системы для доставки, доступные в данной области техники, такие как гидрогели, циклодекстрины, биоразлагаемые нанокапсулы, биоадгезивные микросферы или белковоподобные векторы. В некоторых вариантах агенты РНКи могут являться конъюгированными с антителами, обладающими сродством к клеткам скелетных мышц. В некоторых вариантах агенты РНКи могут являться связанными с направляющими лигандами, обладающими сродством к клеткам скелетных мышц или рецепторам, присутствующим на клетках скелетных мышц.

Фармакокинетические/фармакодинамические (ФК/ФД) модуляторы

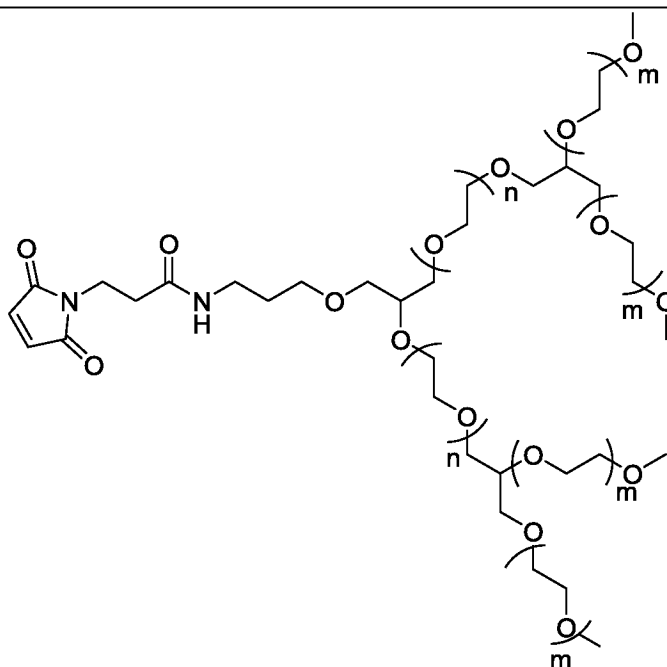
В некоторых вариантах агенты РНКи DUX4, раскрытые в данном контексте, дополнительно или альтернативно связаны с одним или несколькими модуляторами ФК/ФД. Примеры определенных фармакодинамических/фармакокинетических (ФК/ФД) модуляторов, пригодных

для использования с агентами РНКи, раскрытыми в данном контексте, представлены в таблице 6.4. Указанные в таблице 6.4 модуляторы ФК/ФД были использованы в виде выпускаемых фирмой препаратов, или были синтезированы с использованием выпускаемых фирмой материалов.

5

Таблица 6.4

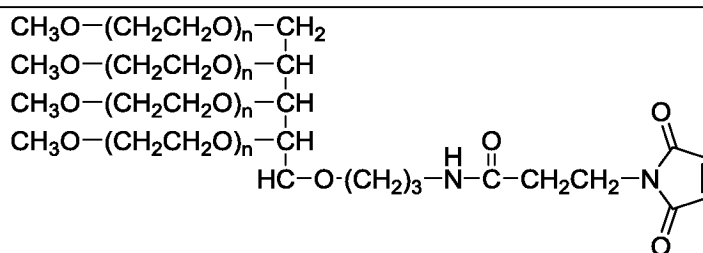
Примеры соединений модуляторов ФК/ФД.



ПЭГ40К (2х цепь с двумя разветвлениями),

где n и m представляют собой целые числа, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 40 кДа

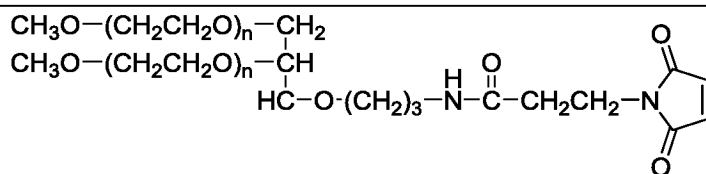
NOF, Sunbright® GL4-400MA



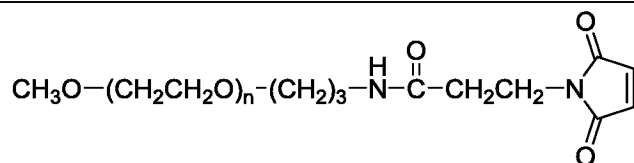
ПЭГ40К (цепь с четырьмя разветвлениями),

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 40 кДа

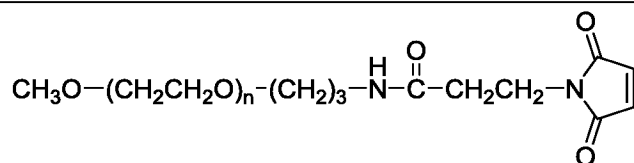
NOF, Sunbright® XY4-400MA



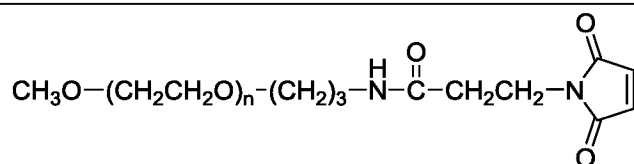
ПЭГ40К (цепь с двумя разветвлениями),
 где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ
 составляет приблизительно 40 кДа
 NOF, Sunbright® GL2-400MA



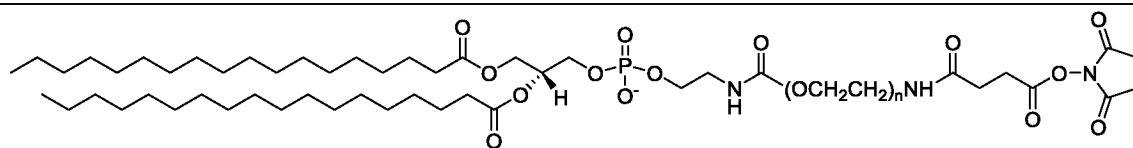
ПЭГ40К,
 где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ
 составляет приблизительно 40 кДа
 NOF, Sunbright® ME-400MA



ПЭГ10К,
 где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ
 составляет приблизительно 10 кДа
 NOF, Sunbright® ME-100MA

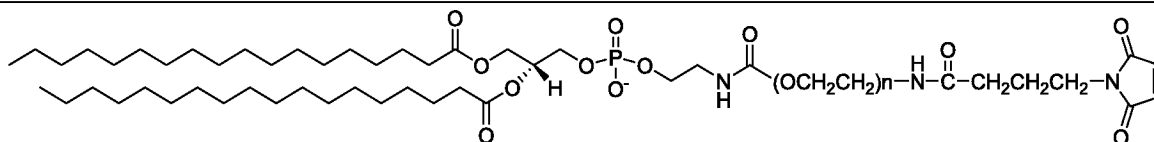


ПЭГ5К,
 где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ
 составляет приблизительно 5 кДа
 NOF, Sunbright® ME-050MA



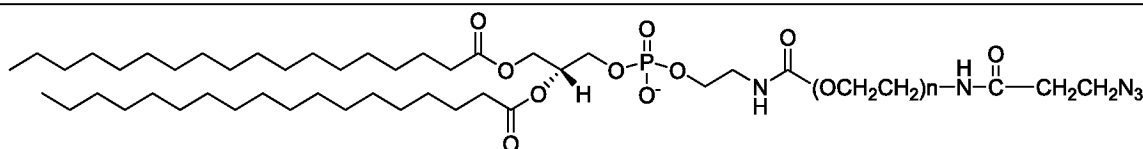
DSPE-ПЭГ5K-NHS (Naonsoft Polymers™ #SKU 1544)

(1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[сукцинимидил(полиэтиленгликоль)]), где *n* представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 5 кДа



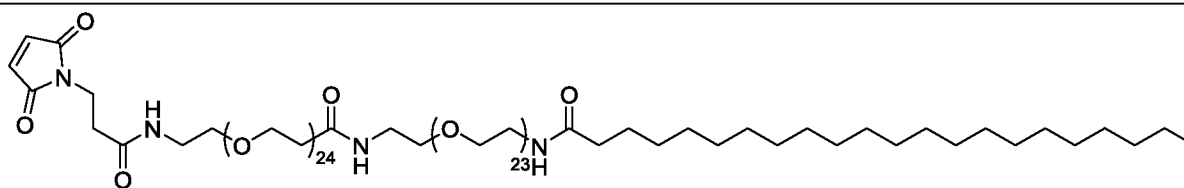
DSPE-ПЭГ5K-MAL (Naonsoft Polymers™ SKU #2049)

1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[малеимид (полиэтиленгликоль)],
где *n* представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 5 кДа

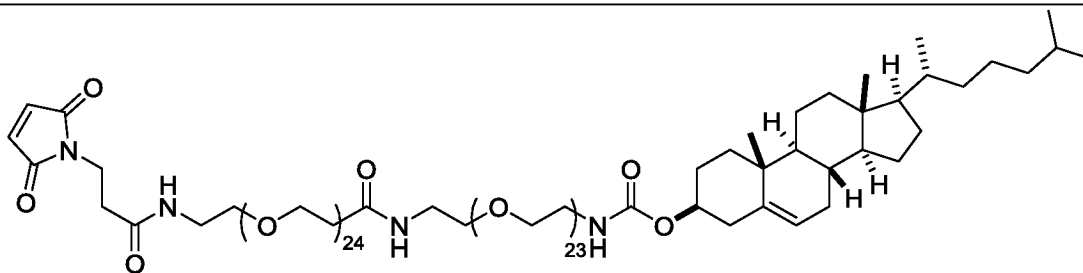


DSPE-ПЭГ5K-N3 (Naonsoft Polymers™ SKU #2274)

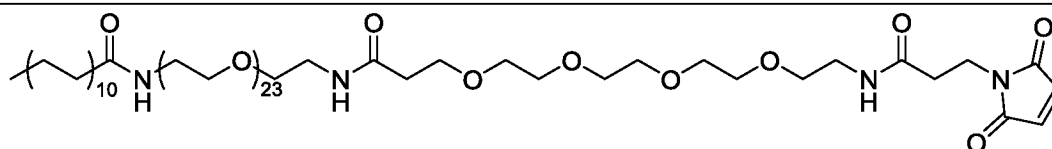
1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[азидо(полиэтиленгликоль)], где *n* представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 5 кДа



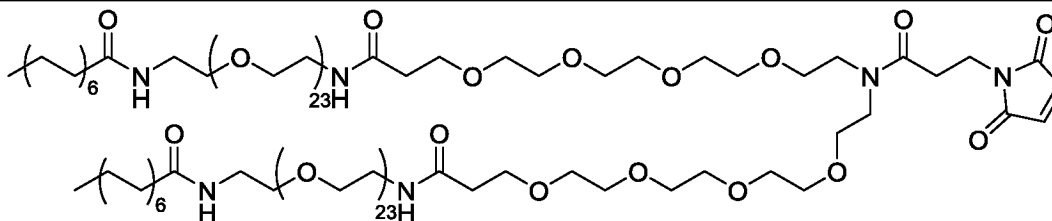
ПЭГ47+C22



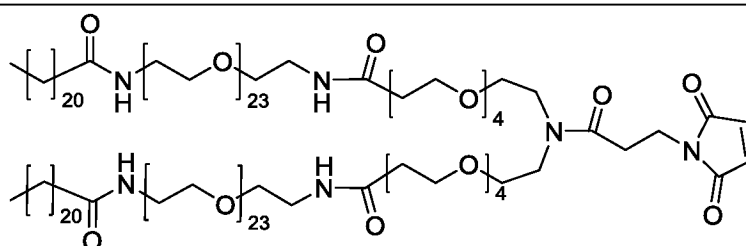
ПЭГ47+CLS (холестерин)



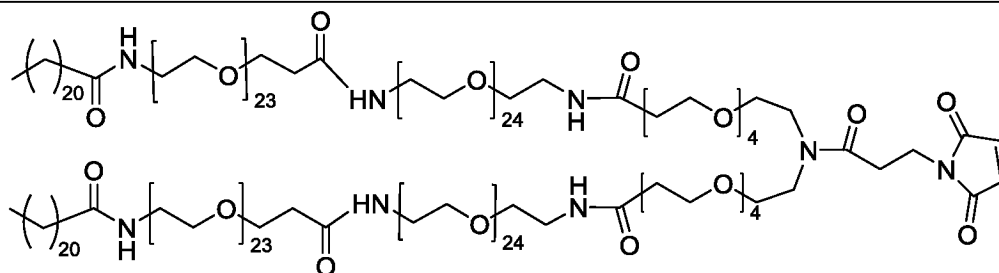
ПЭГ23+С22



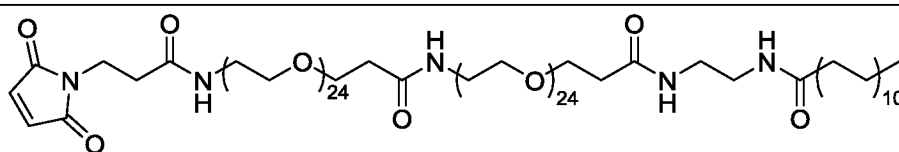
Бис(ПЭГ23+С14)



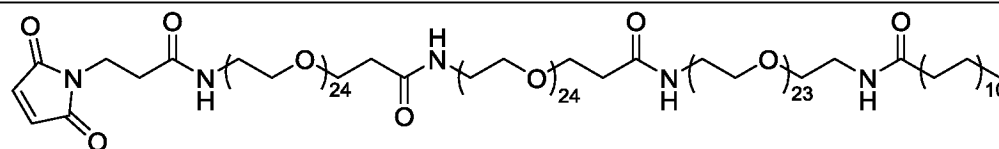
Бис(ПЭГ23+С22)



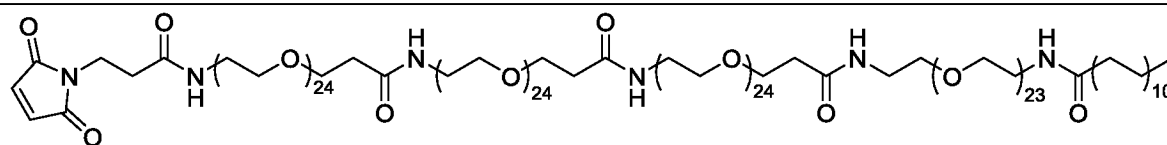
Бис(ПЭГ47+С22)

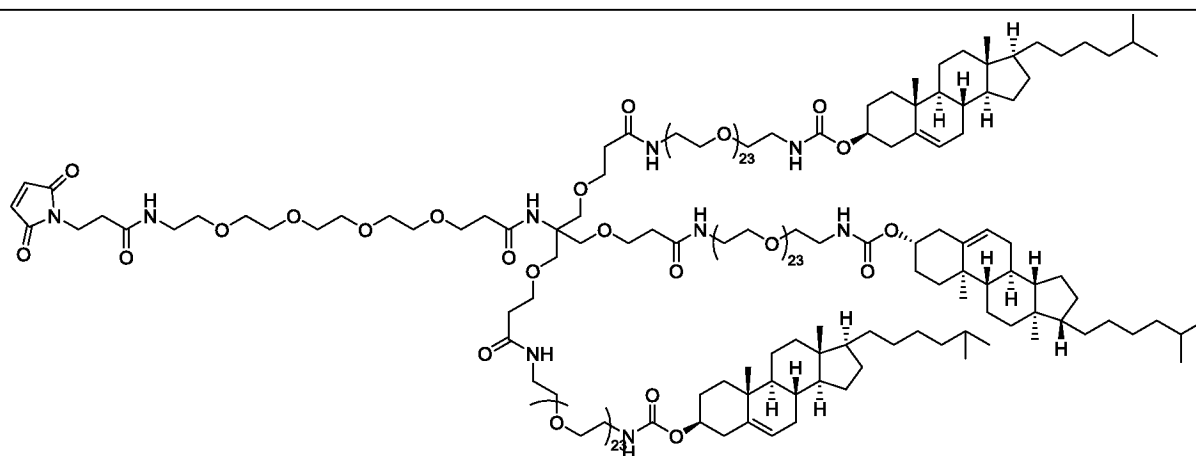


ПЭГ48+С22

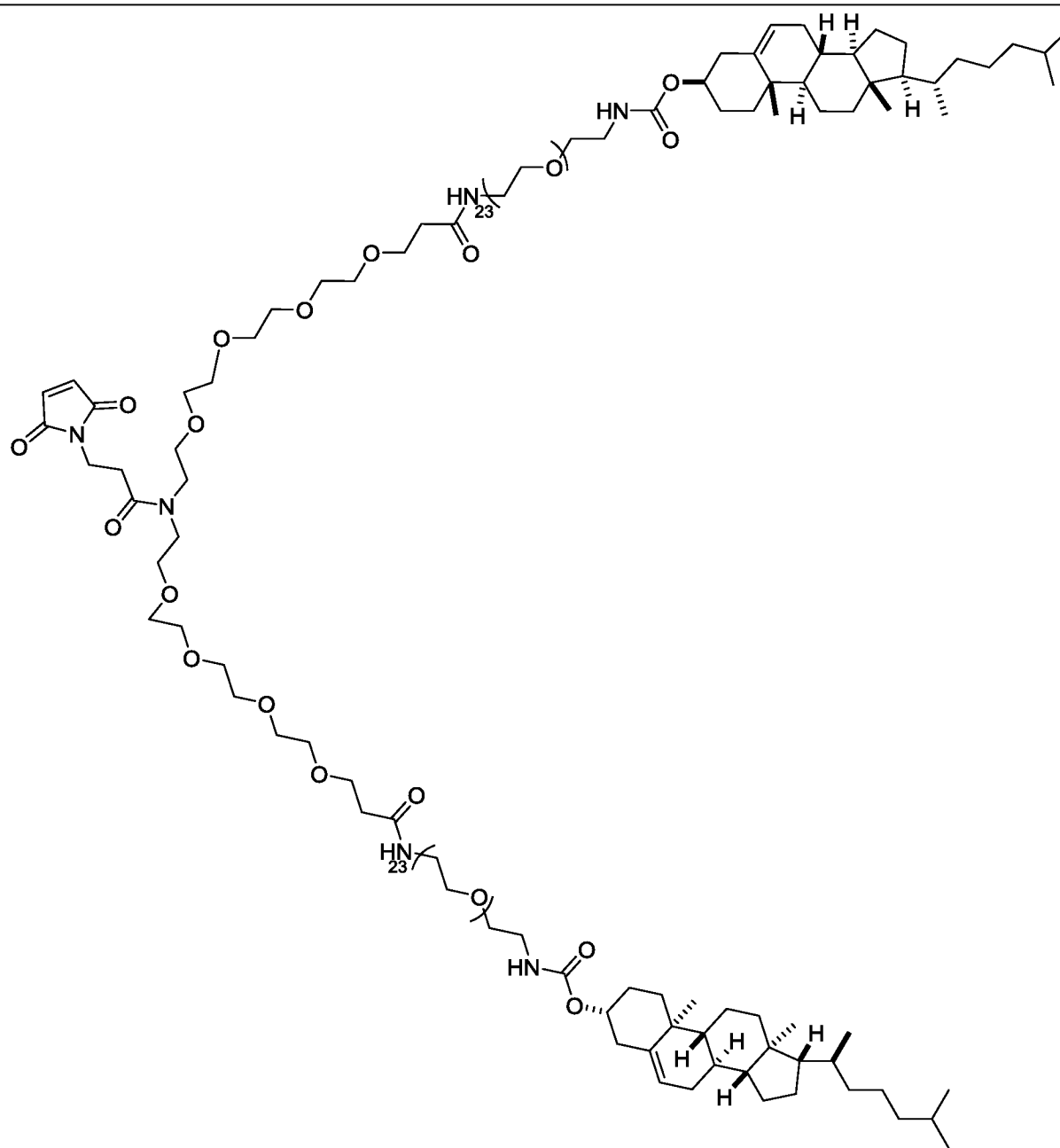


ПЭГ71+С22

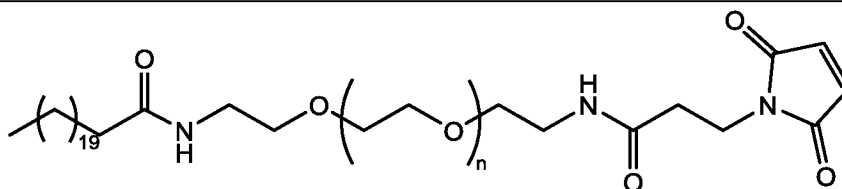




Трис(ПЭГ23+CLS)

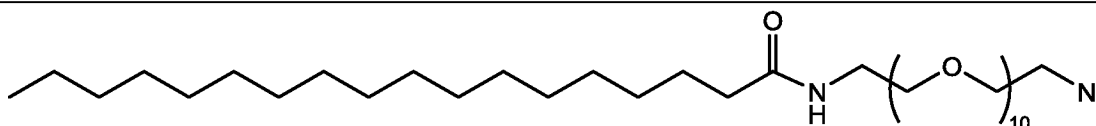


Бис(ПЭГ23+CLS)

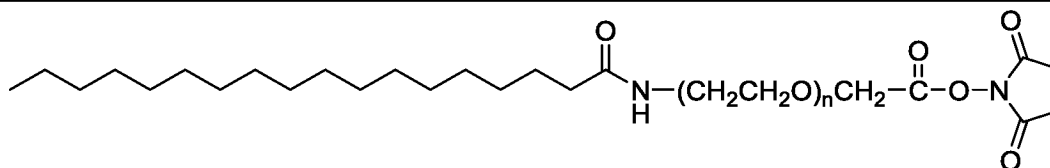


ПЭГ5K+C22

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 5 кДа

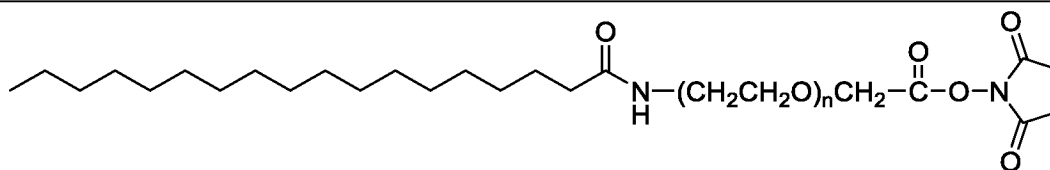


C18



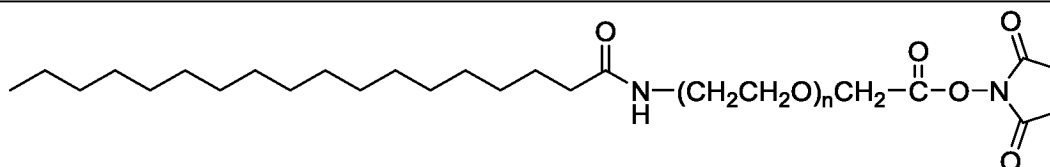
(NHS)-ПЭГ1K+C18 (Nanosoft Polymers™ SKU #10668-1000)

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 1 кДа



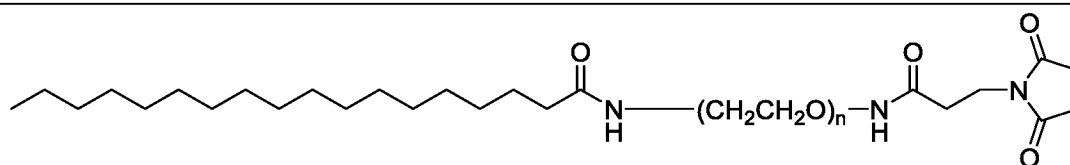
(NHS)-ПЭГ2K+C18 (Nanosoft Polymers™ SKU #10668-2000)

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 2 кДа



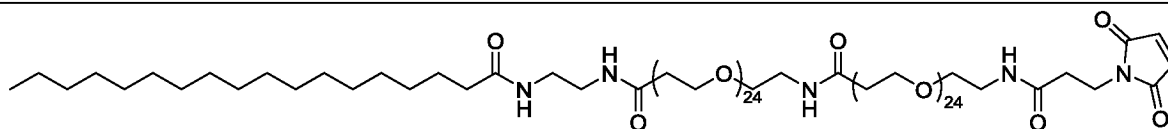
(NHS)-ПЭГ5K+C18 (Nanosoft Polymers™ SKU #10668-5000)

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 5 кДа



(MAL)-ПЭГ5К+С18 (Nanosoft Polymers™ SKU #10647)

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 5 кДа



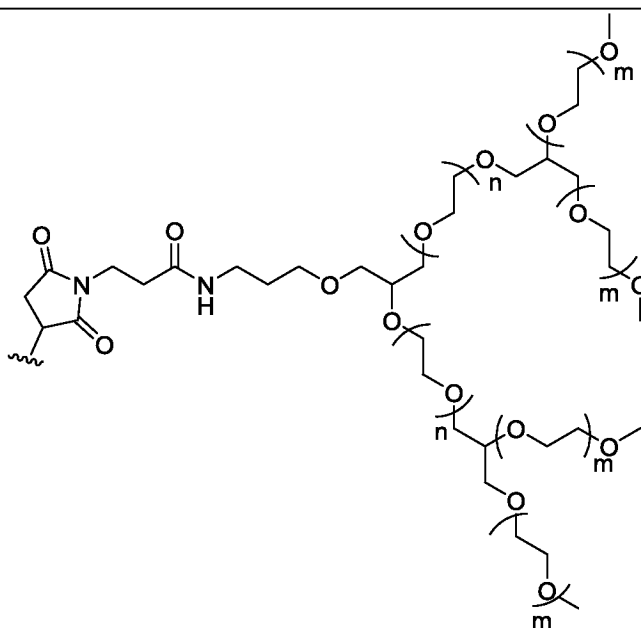
ПЭГ48+С18

В некоторых вариантах модуляторы ФК/ФД из таблицы 6.4 характеризуются следующими структурами после конъюгации с агентами РНКи DUX4, как показано в таблице 6.5.

5

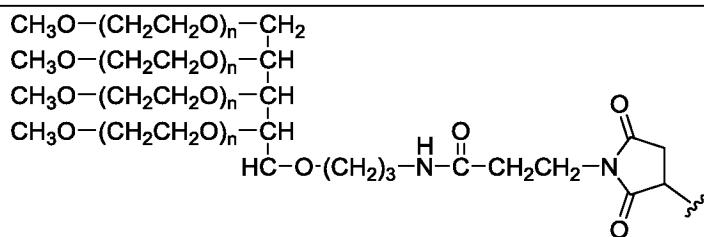
Таблица 6.5

Примеры модуляторов ФК/ФД, конъюгированных с агентами РНКи DUX4

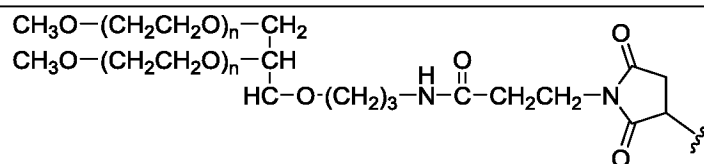


ПЭГ40К (2х цепь с двумя разветвлениями),

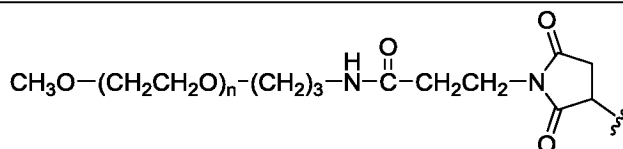
где n и m представляют собой целые числа, а молекулярная масса групп ПЭГ составляет приблизительно 40 кДа



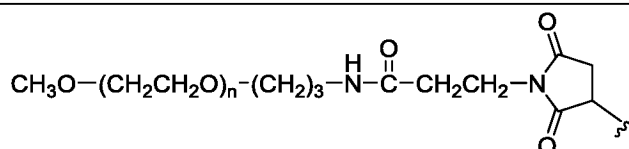
ПЭГ40К (цепь с четырьмя разветвлениями),
где n представляет собой целое число, а молекулярная масса групп ПЭГ
составляет приблизительно 40 кДа



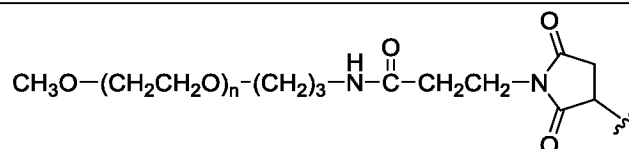
ПЭГ40К (цепь с двумя разветвлениями),
где n представляет собой целое число, а молекулярная масса групп ПЭГ
составляет приблизительно 40 кДа



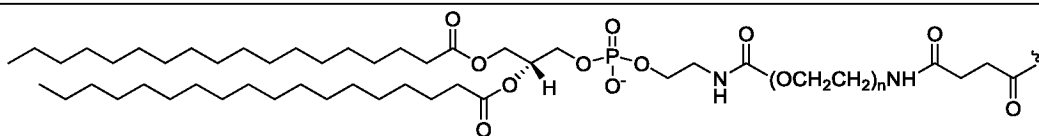
ПЭГ40К,
где n представляет собой целое число, а молекулярная масса групп ПЭГ
составляет приблизительно 40 кДа



ПЭГ10К,
где n представляет собой целое число, а молекулярная масса групп ПЭГ
составляет приблизительно 10 кДа

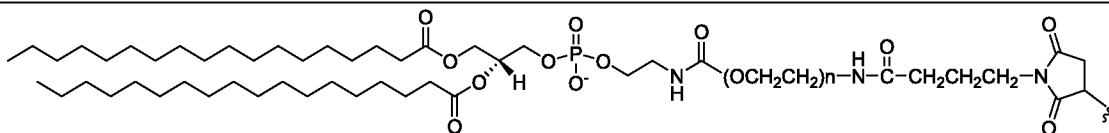


ПЭГ5К,
где n представляет собой целое число, а молекулярная масса групп ПЭГ
составляет приблизительно 5 кДа



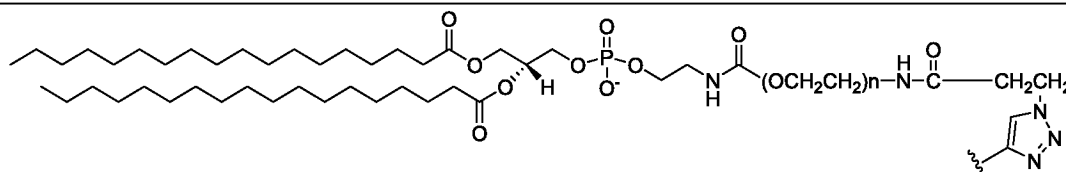
DSPE-ПЭГ5K-NHS

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса групп ПЭГ составляет приблизительно 5 кДа



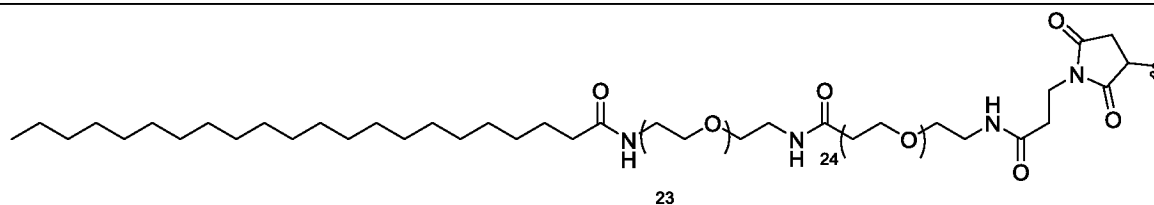
DSPE-ПЭГ5K-MAL

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса групп ПЭГ составляет приблизительно 5 кДа

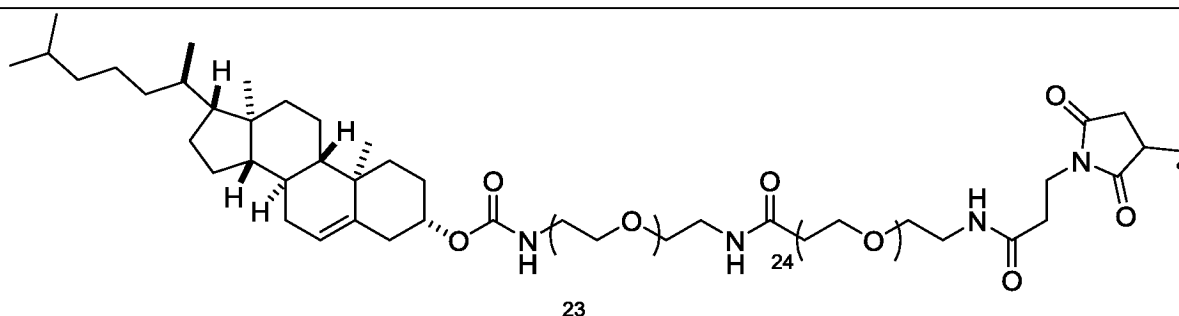


DSPE-ПЭГ5K-N3

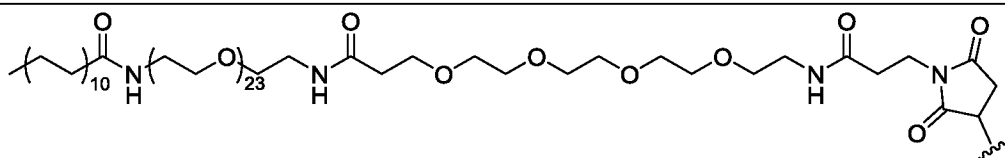
где n представляет собой целое число, а молекулярная масса групп ПЭГ составляет приблизительно 5 кДа



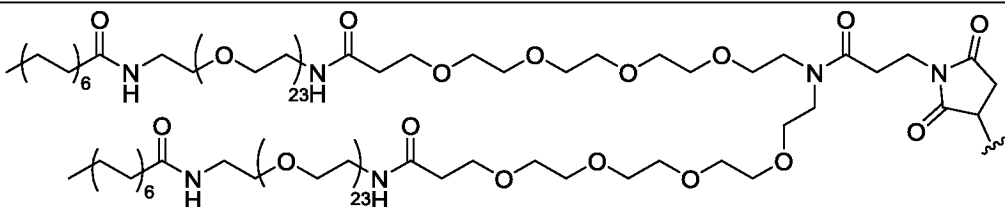
ПЭГ47+C22



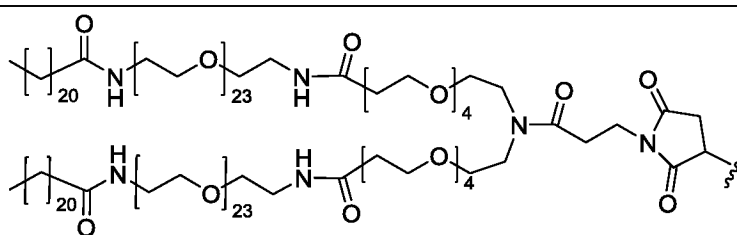
ПЭГ47+CLS (холестерин)



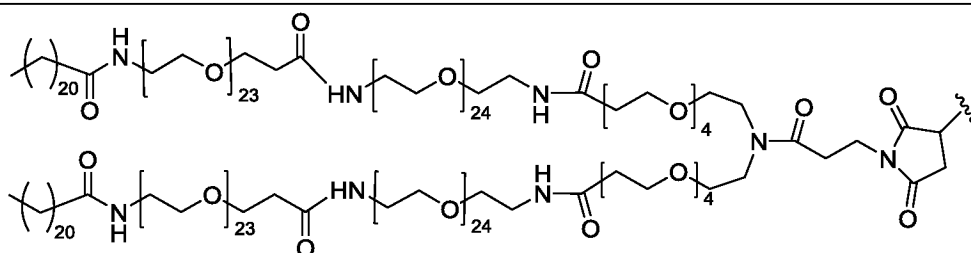
ПЭГ23+С22



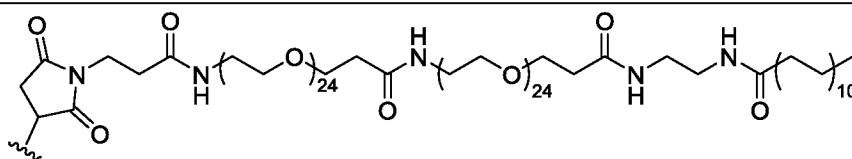
Бис(ПЭГ23+С14)



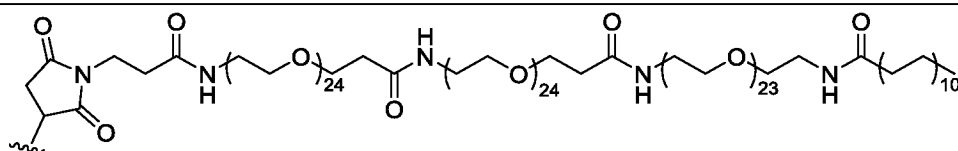
Бис(ПЭГ23+С22)



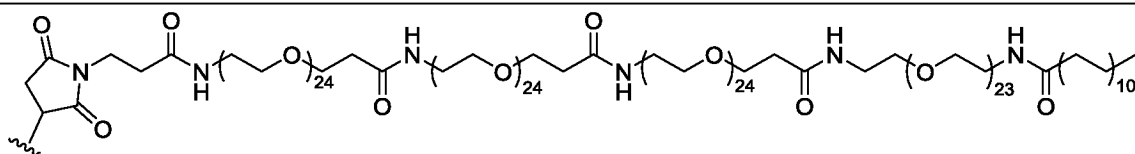
Бис(ПЭГ47+С22)



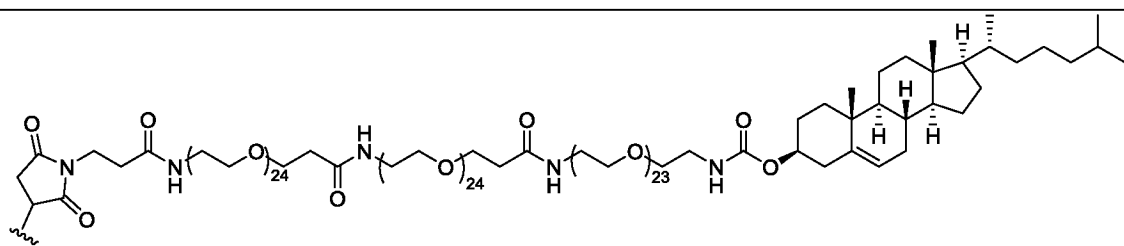
ПЭГ48+С22



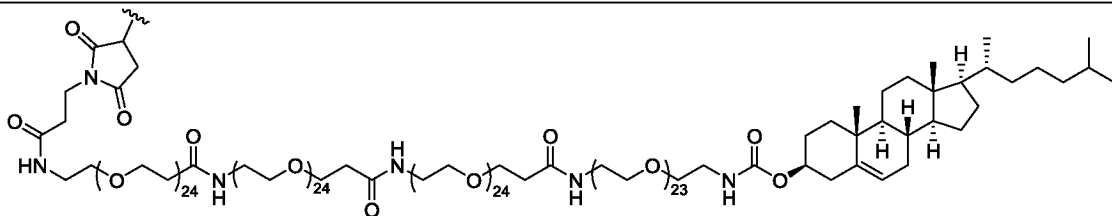
ПЭГ71+С22



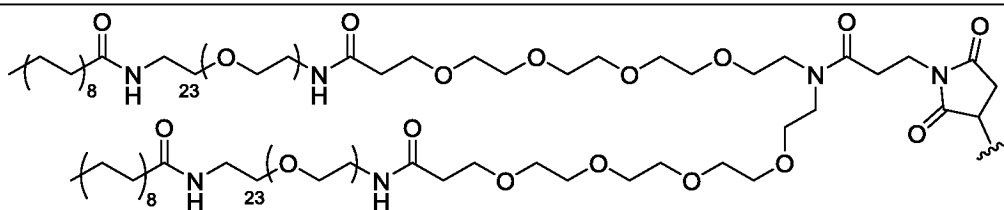
ПЭГ95+С22



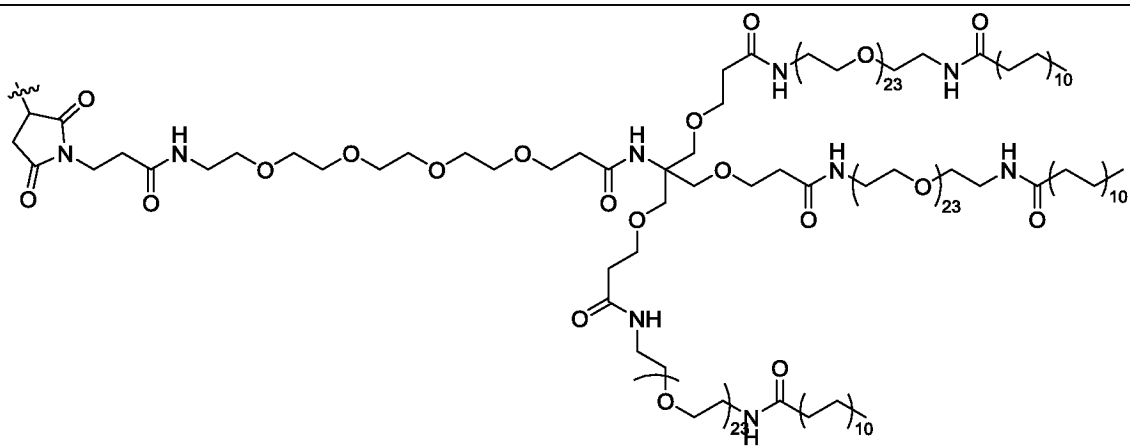
ПЭГ71+CLS



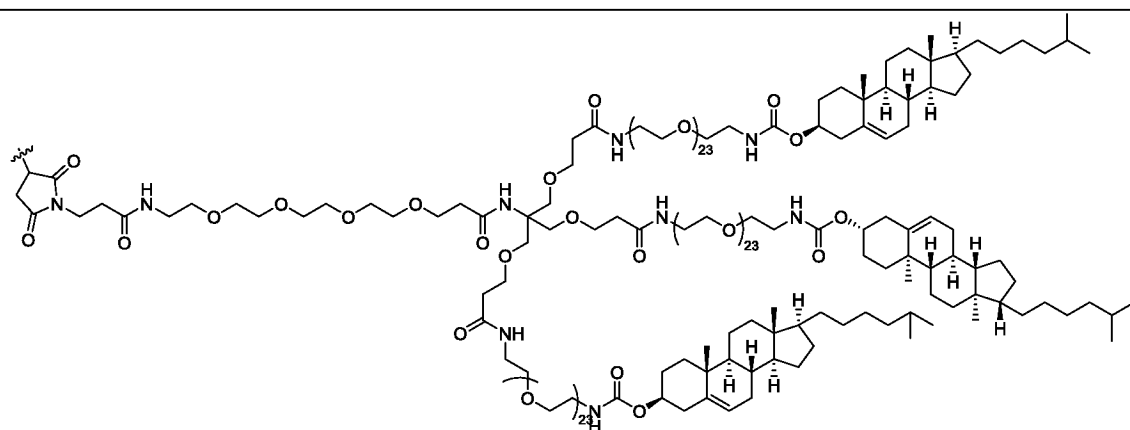
ПЭГ95+CLS



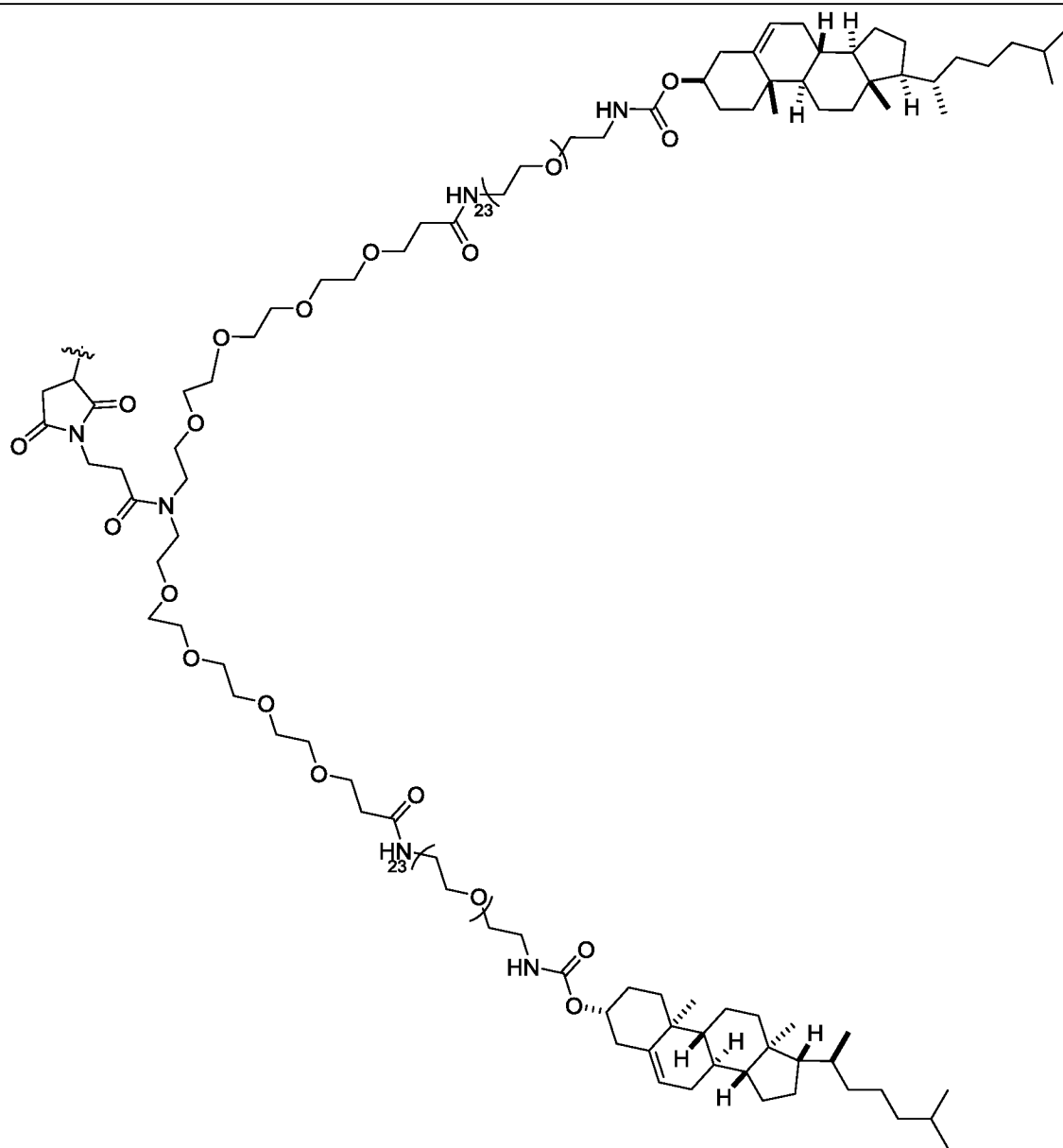
Бис(ПЭГ23+С18)



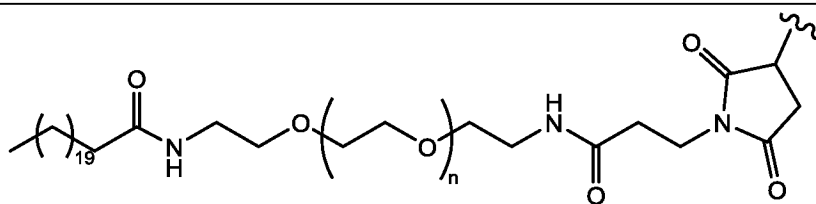
Трис(ПЭГ23+С22)



Трис(ПЭГ23+CLS)

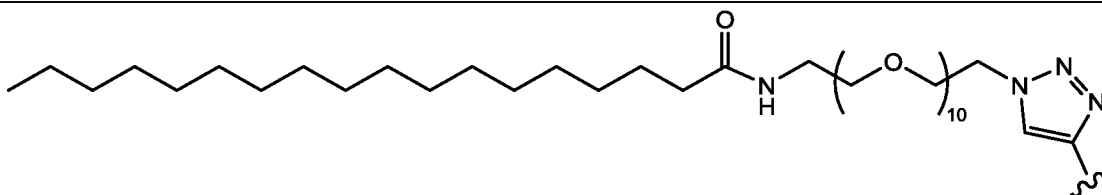


Бис(ПЭГ23+CLS)

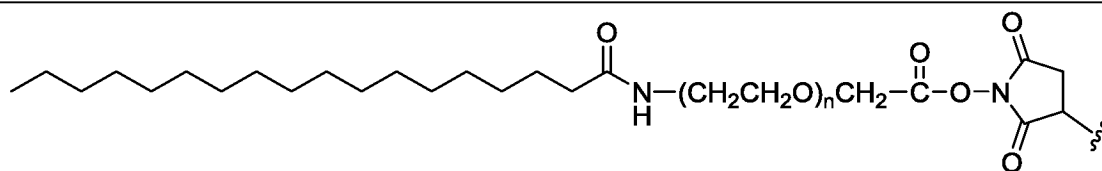


ПЭГ5К+С22

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 5 кДа

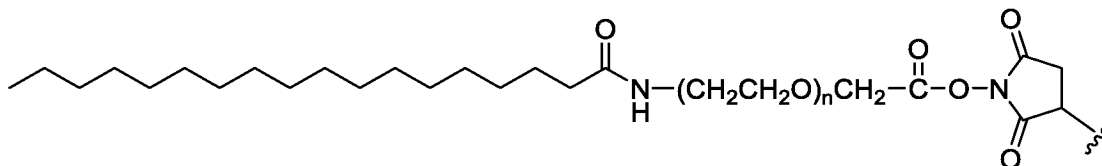


C18



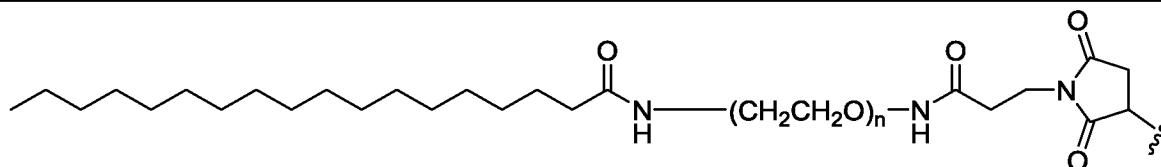
(NHS)-ПЭГ1К+С18

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 1 кДа



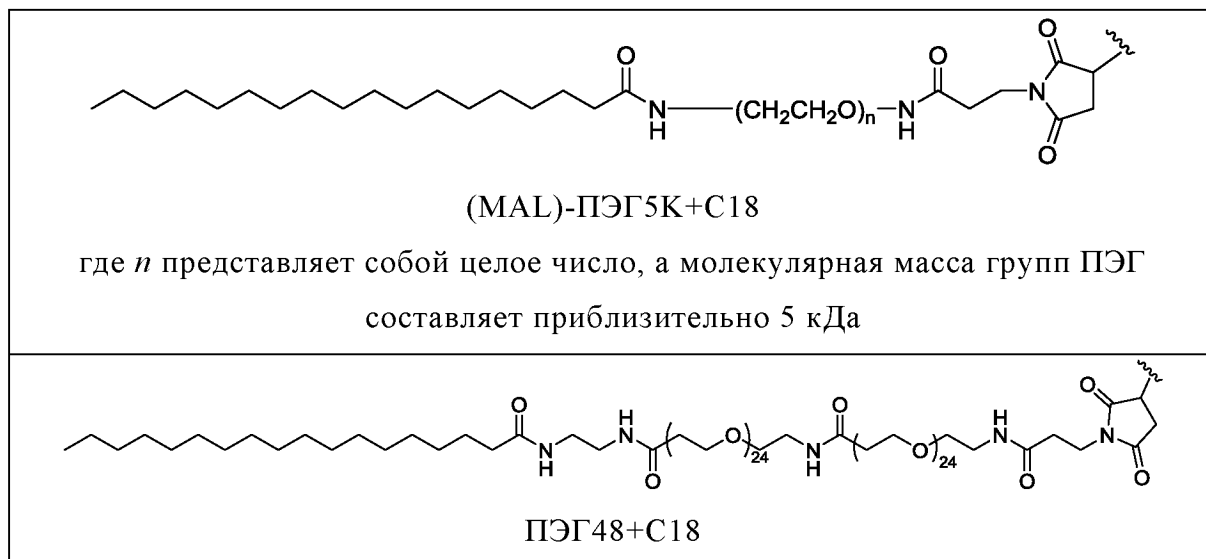
(NHS)-ПЭГ2К+С18

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 2 кДа



(NHS)-ПЭГ5К+С18

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса групп ПЭГ составляет приблизительно 5 кДа

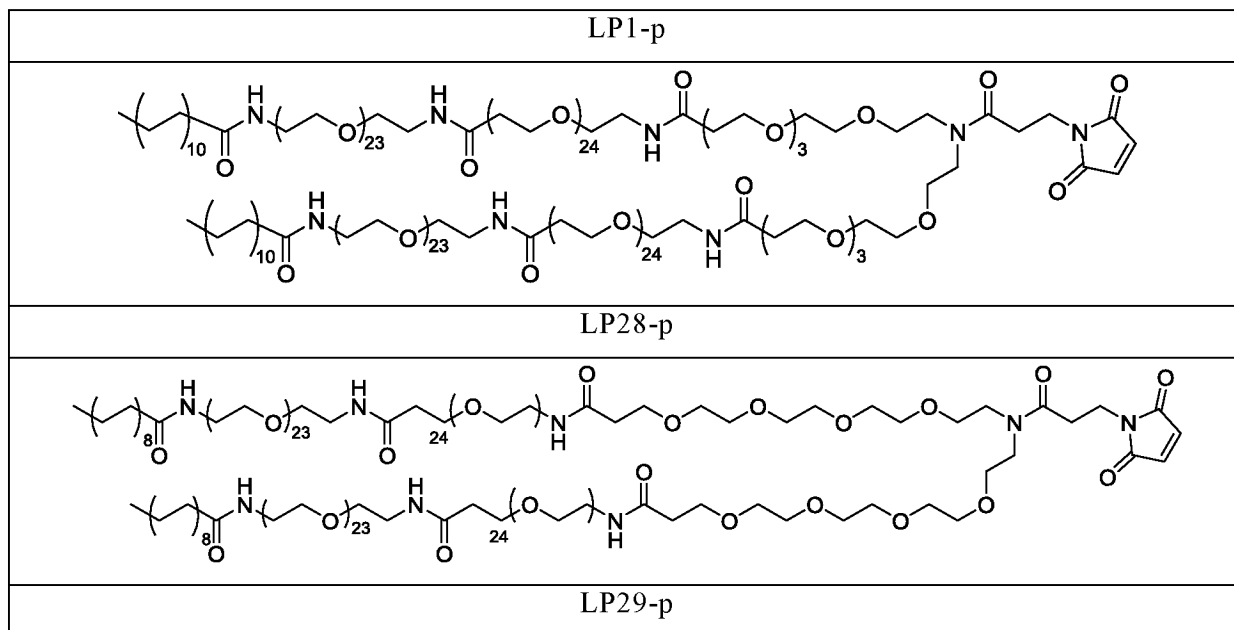


или их фармацевтически приемлемых солей, где элемент  указывает на место присоединения к агентам РНКи DUX4.

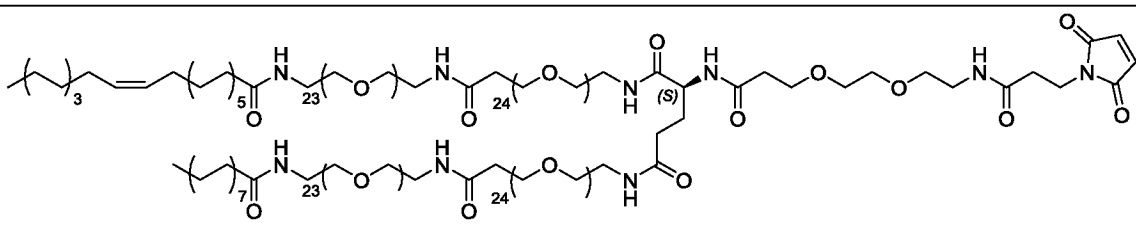
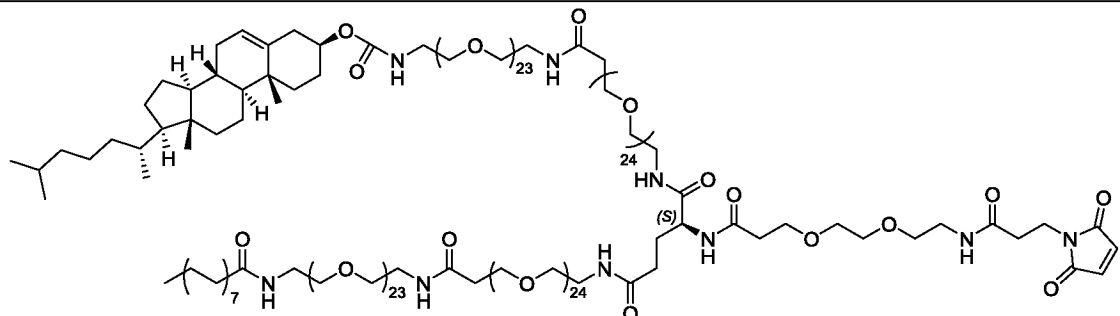
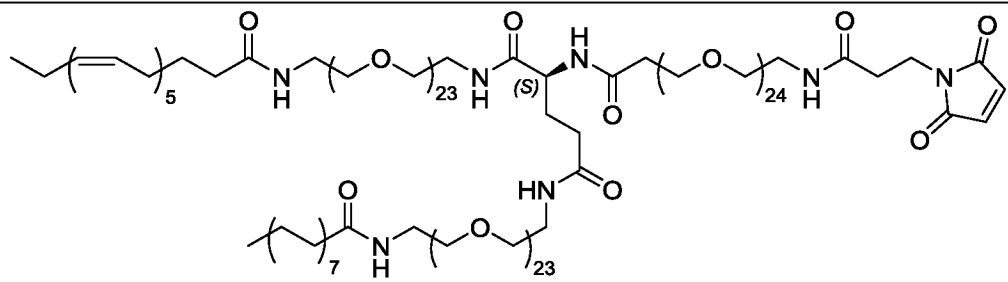
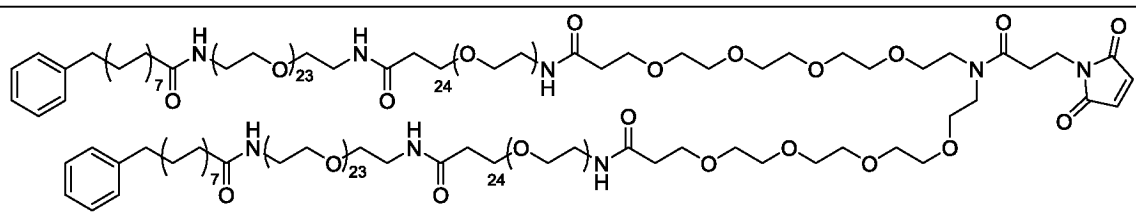
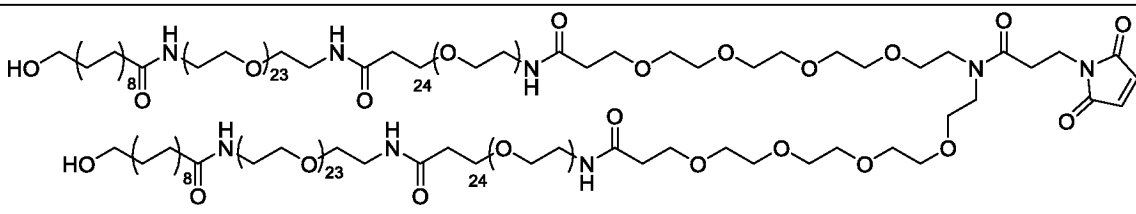
В других вариантах модулятор ФК/ФД, который можно конъюгировать с агентами РНКи DUX4, описанными в данном контексте, можно выбрать из группы, состоящей из модуляторов ФК/ФД, указанных в таблице 6.6.

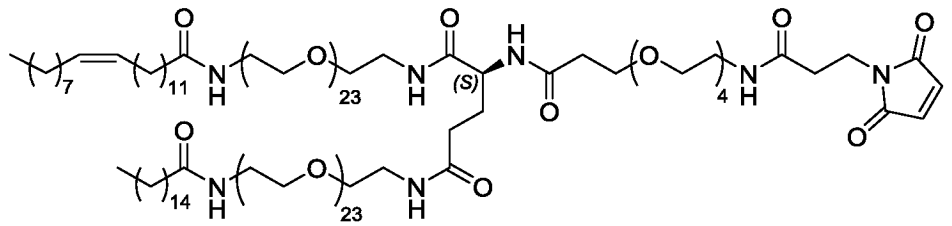
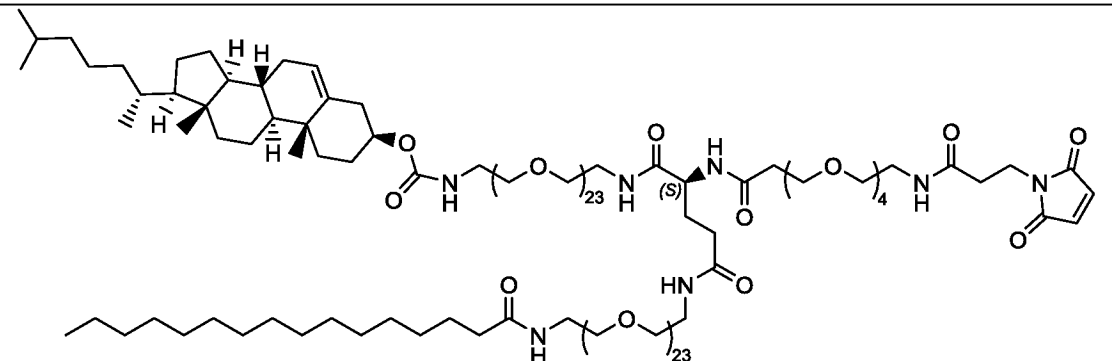
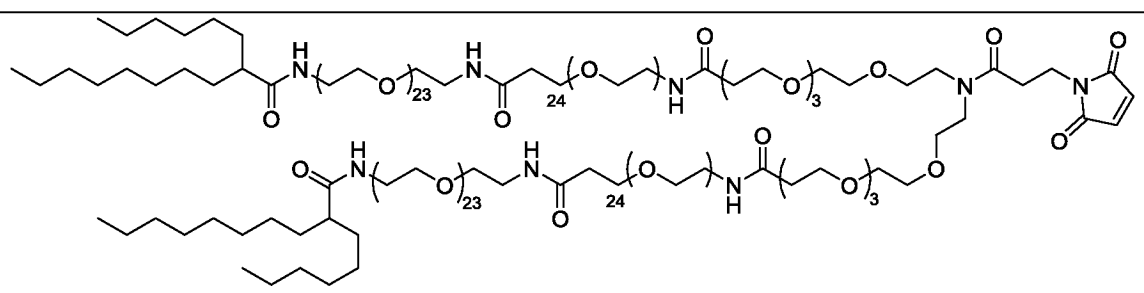
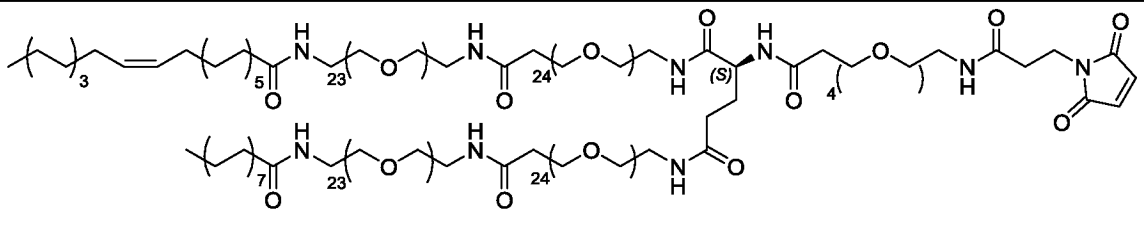
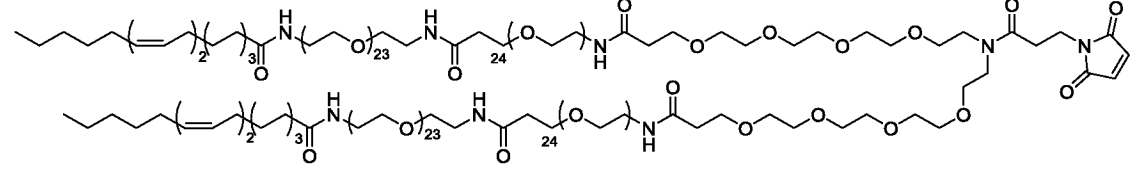
Таблица 6.6

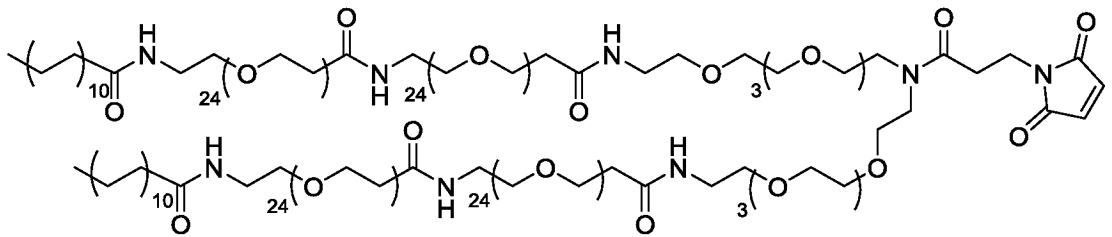
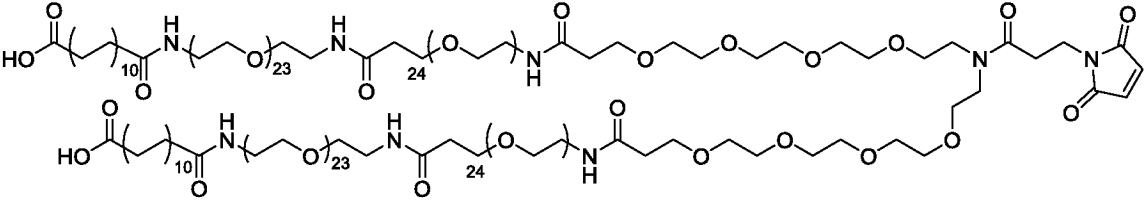
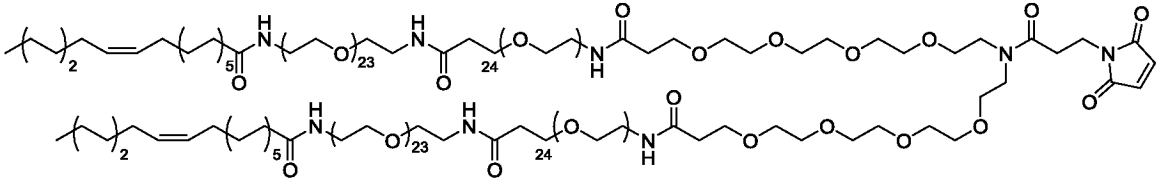
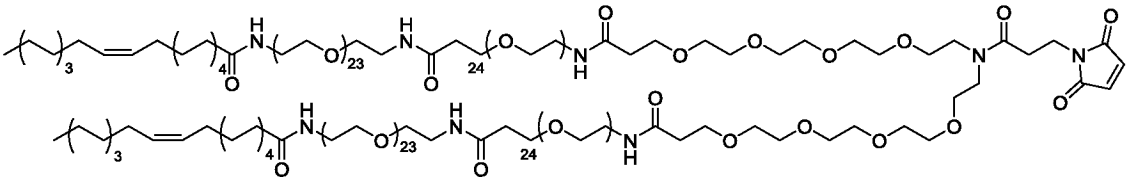
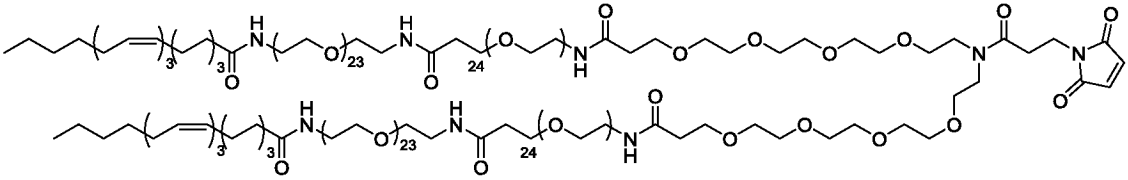
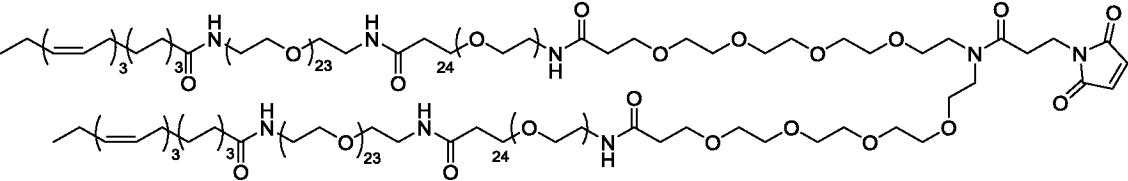
Примеры модуляторов ФК/ФД для конъюгации с агентами РНКи DUX4 (номер соединения указан перед структурой).

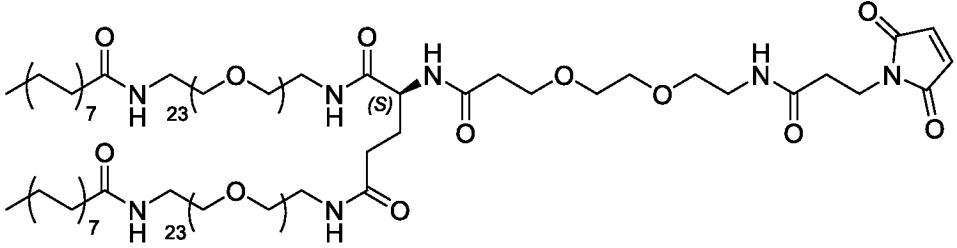
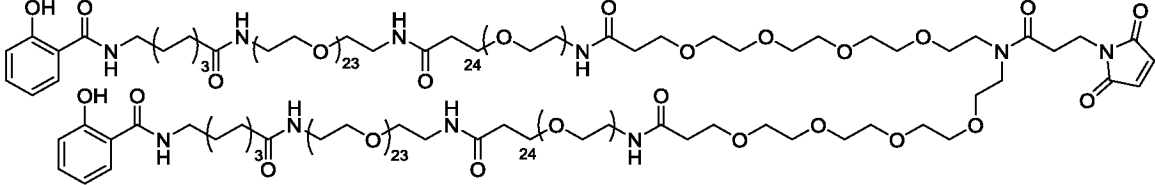
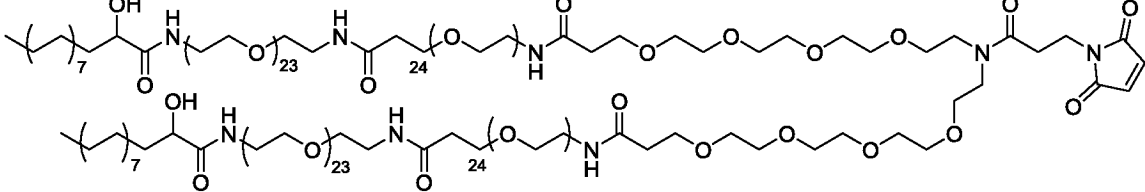
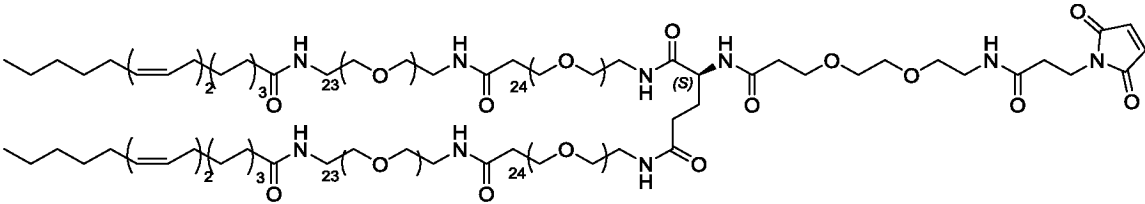
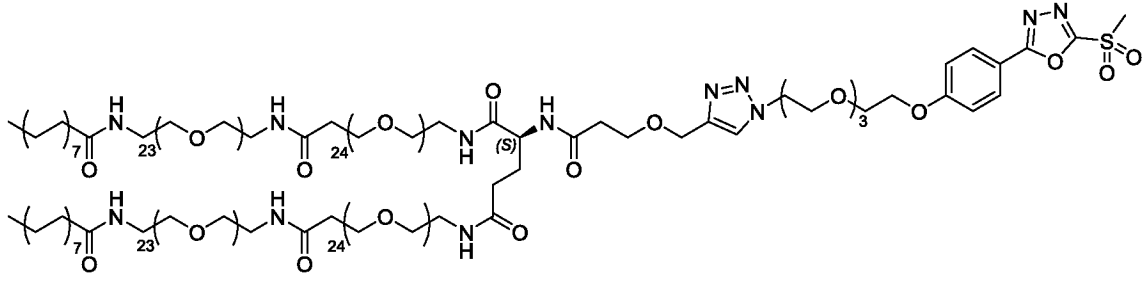
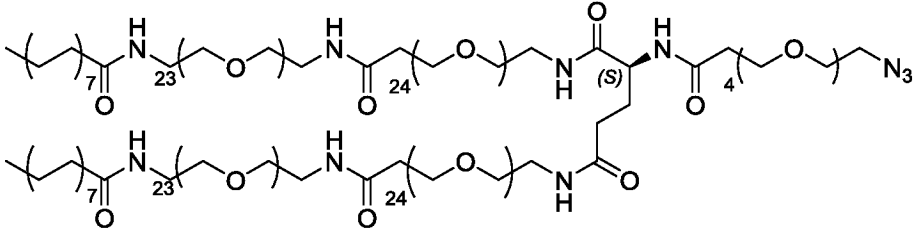


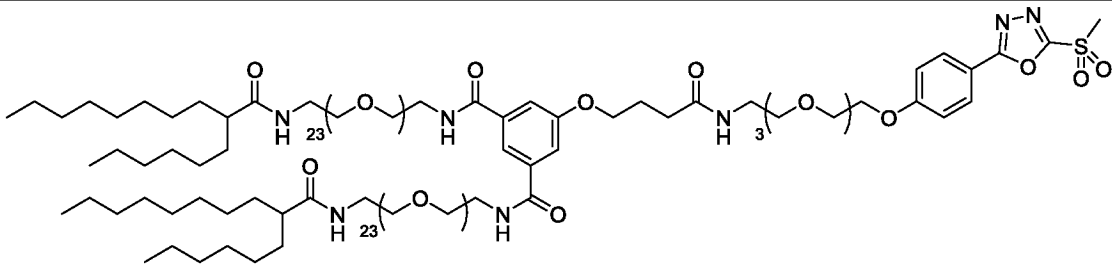
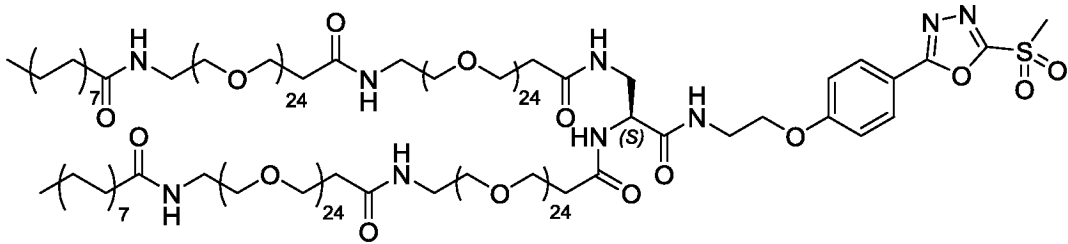
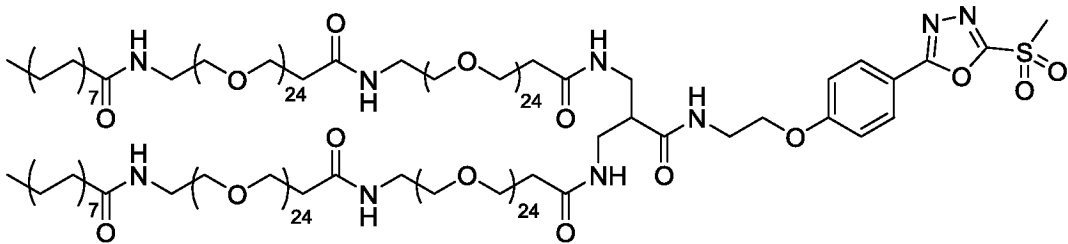
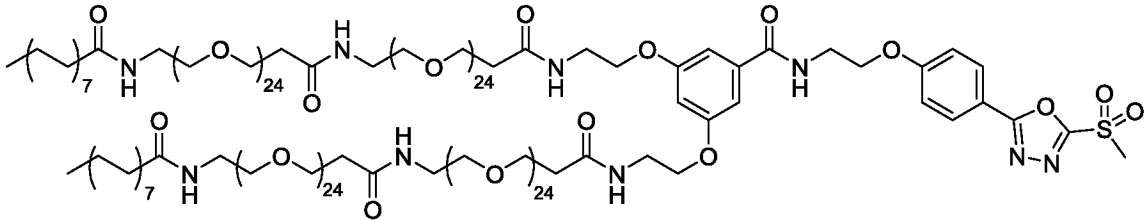
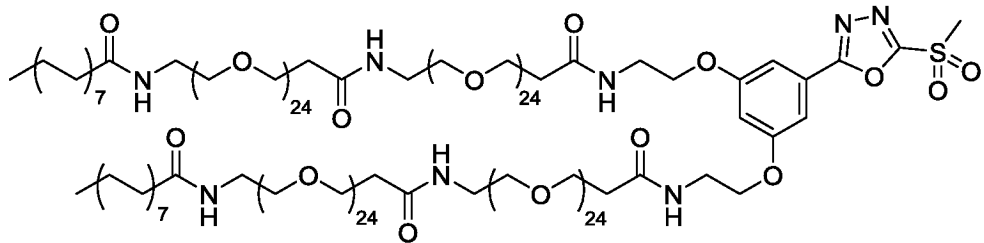
Chemical structure of LP38-p, a linear polyether-ester copolymer. It consists of two main chains. The top chain is a polyether-ester copolymer with repeating units of 7 and 23, followed by a 24-unit segment, and a terminal 24-unit segment. The bottom chain is a polyether-ester copolymer with repeating units of 7 and 23, followed by a 24-unit segment, and a terminal 24-unit segment. The two chains are linked by a central ester linkage.
LP38-p
Chemical structure of LP39-p, a linear polyether-ester copolymer. It consists of two main chains. The top chain is a polyether-ester copolymer with repeating units of 7 and 23, followed by a 24-unit segment, and a terminal 24-unit segment. The bottom chain is a polyether-ester copolymer with repeating units of 7 and 23, followed by a 24-unit segment, and a terminal 24-unit segment. The two chains are linked by a central ester linkage.
LP39-p
Chemical structure of LP41-p, a linear polyether-ester copolymer. It consists of two main chains. The top chain is a polyether-ester copolymer with repeating units of 7 and 23, followed by a 24-unit segment, and a terminal 24-unit segment. The bottom chain is a polyether-ester copolymer with repeating units of 7 and 23, followed by a 24-unit segment, and a terminal 24-unit segment. The two chains are linked by a central ester linkage.
LP41-p
Chemical structure of LP42-p, a linear polyether-ester copolymer. It consists of two main chains. The top chain is a polyether-ester copolymer with repeating units of 7 and 23, followed by a 24-unit segment, and a terminal 24-unit segment. The bottom chain is a polyether-ester copolymer with repeating units of 7 and 23, followed by a 24-unit segment, and a terminal 24-unit segment. The two chains are linked by a central ester linkage.
LP42-p
Chemical structure of LP43-p, a linear polyether-ester copolymer. It consists of two main chains. The top chain is a polyether-ester copolymer with repeating units of 7 and 23, followed by a 24-unit segment, and a terminal 24-unit segment. The bottom chain is a polyether-ester copolymer with repeating units of 7 and 23, followed by a 24-unit segment, and a terminal 24-unit segment. The two chains are linked by a central ester linkage.
LP43-p
Chemical structure of LP44-p, a linear polyether-ester copolymer. It consists of two main chains. The top chain is a polyether-ester copolymer with repeating units of 7 and 23, followed by a 24-unit segment, and a terminal 24-unit segment. The bottom chain is a polyether-ester copolymer with repeating units of 7 and 23, followed by a 24-unit segment, and a terminal 24-unit segment. The two chains are linked by a central ester linkage.

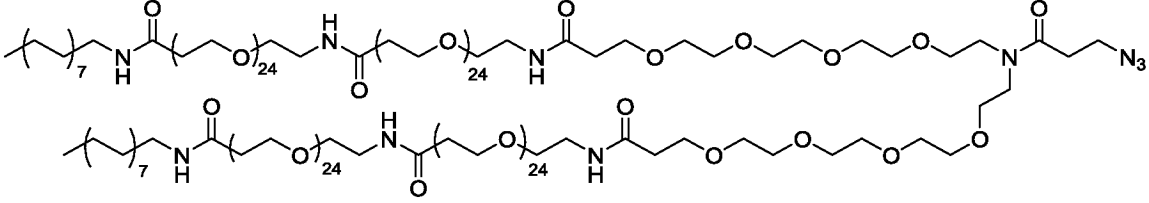
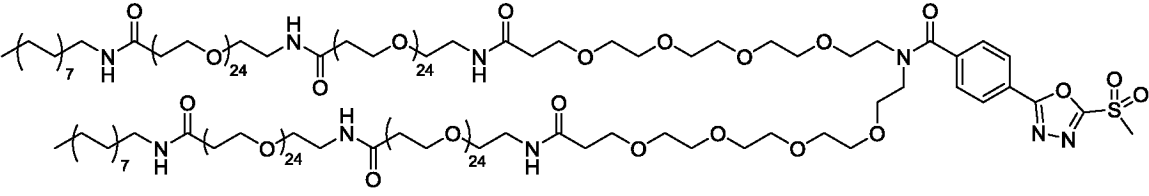
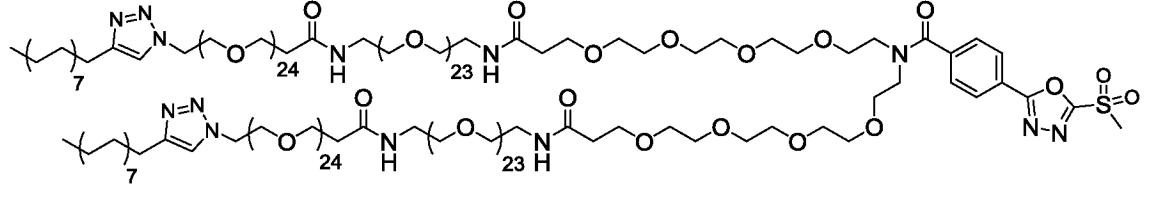
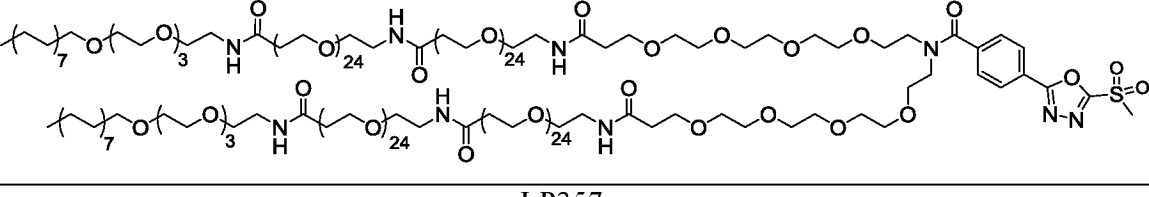
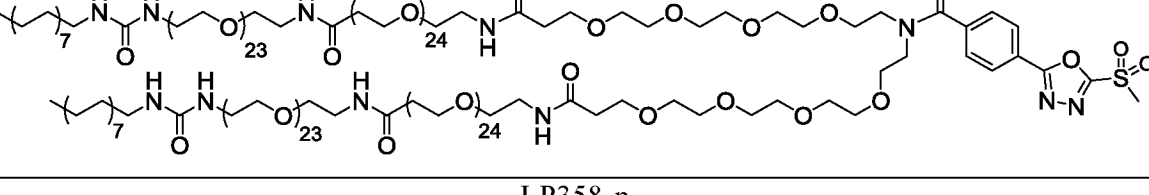
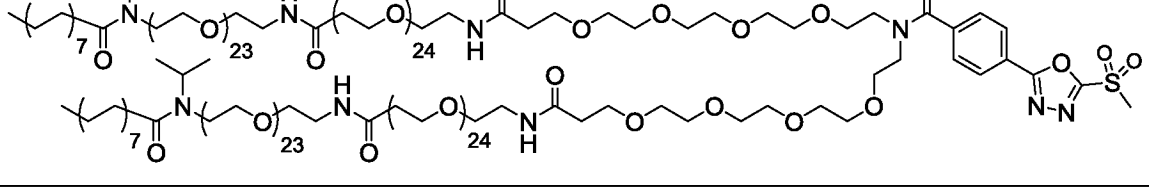
LP44-p

LP45-p

LP47-p

LP48-p

LP49-p

LP53-p


LP60-p

LP61-p

LP62-p

LP87-p

LP89-p


LP90-p

LP92-p

LP93-p

LP94-p

LP95-p

LP101-p


LP102-p

LP103-p

LP104-p

LP106-p

LP107-p

LP108-p

LP143-p

LP210-p

LP217-p

LP220-p

LP221-p

LP223-p

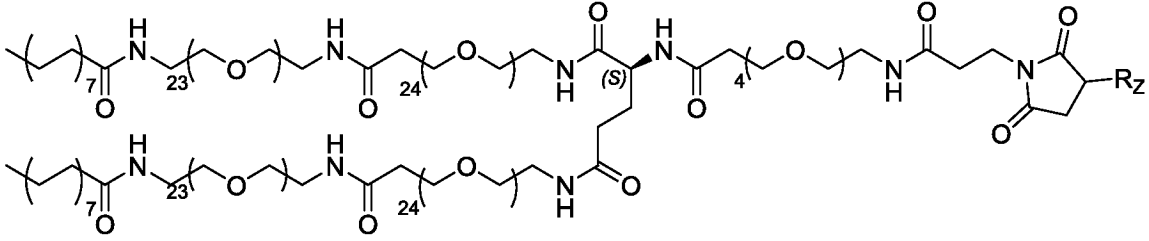
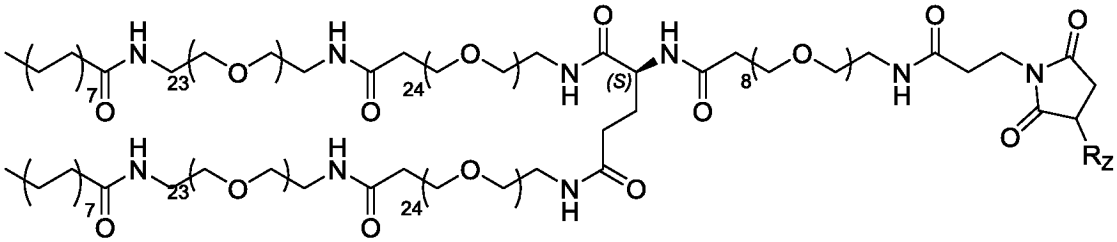
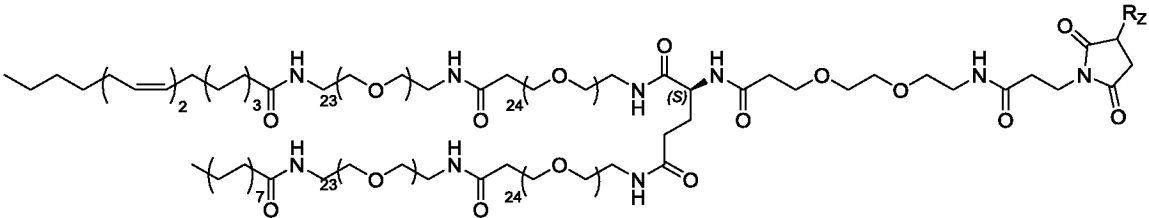
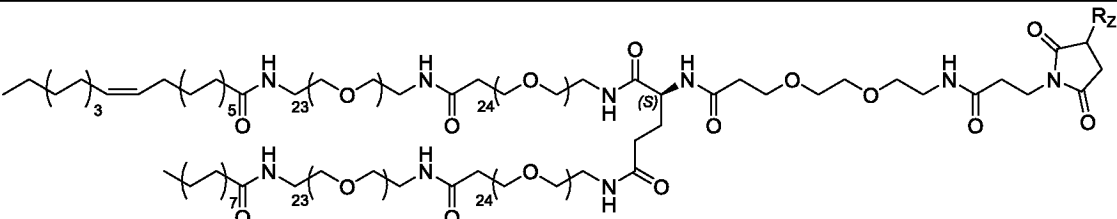
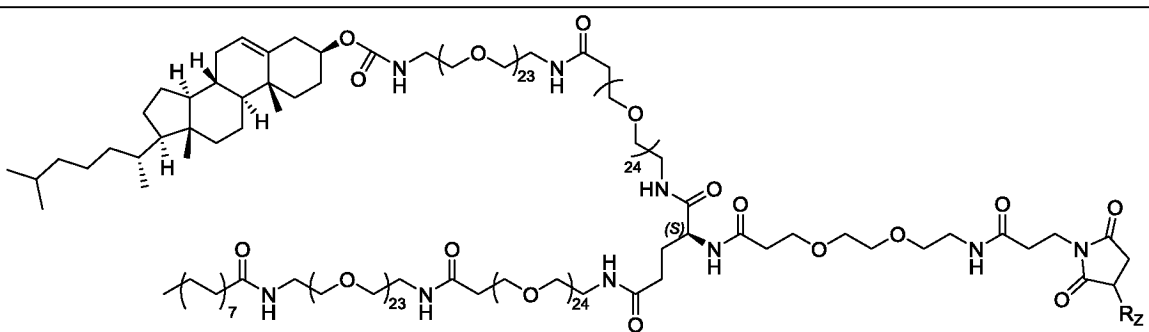

LP247-p

LP339-p

LP340-p

LP357-p

LP358-p


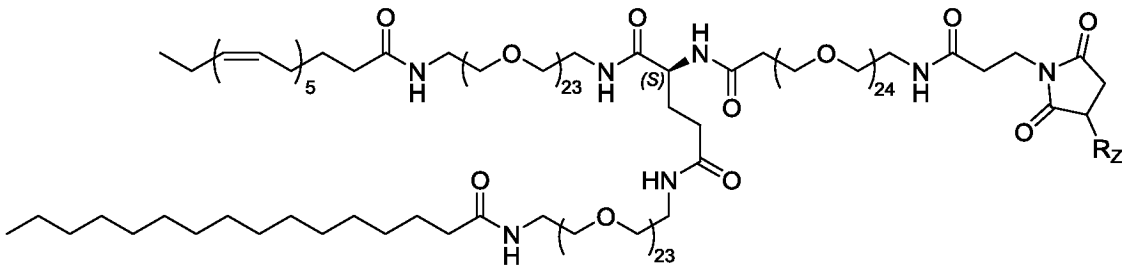
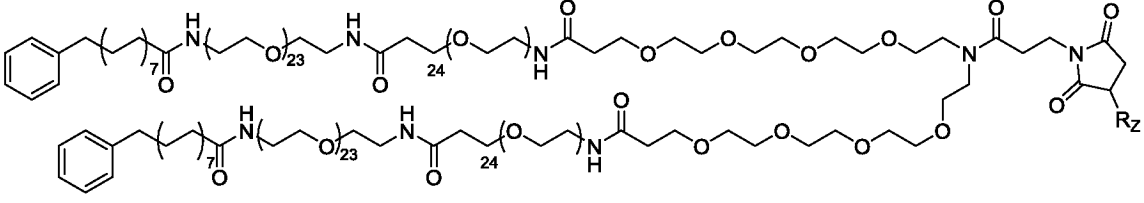
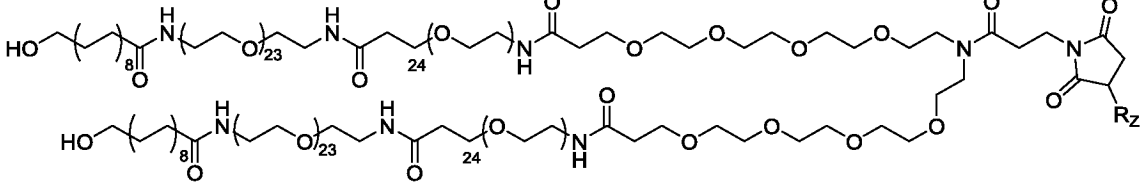
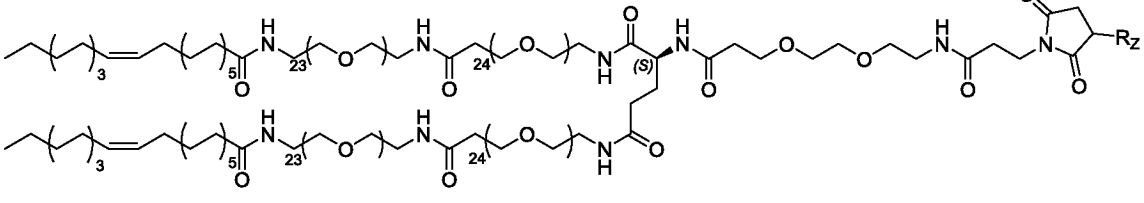
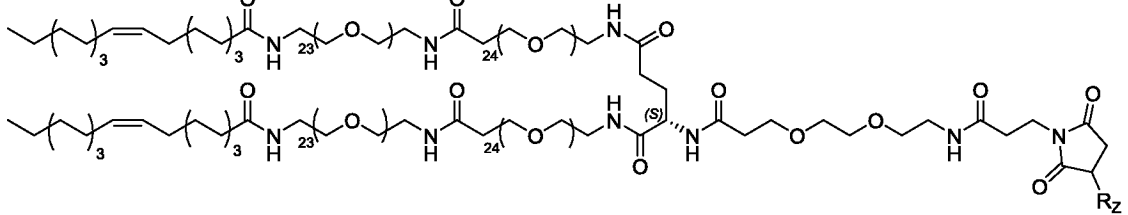
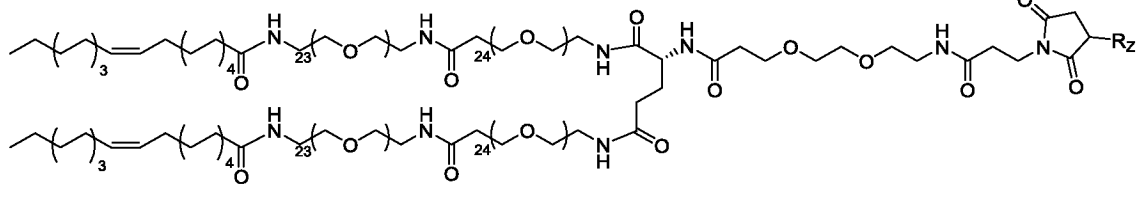
В некоторых вариантах модуляторы ФК/ФД из таблицы 6.6 характеризуются следующими структурами после конъюгации с агентами РНКи DUX4, как показано в таблице 6.7.

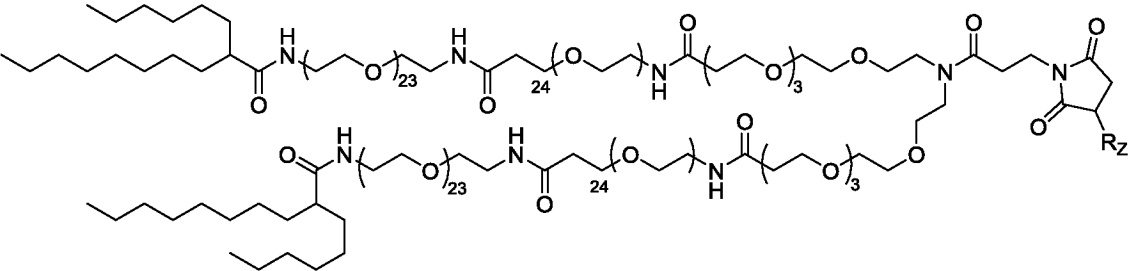
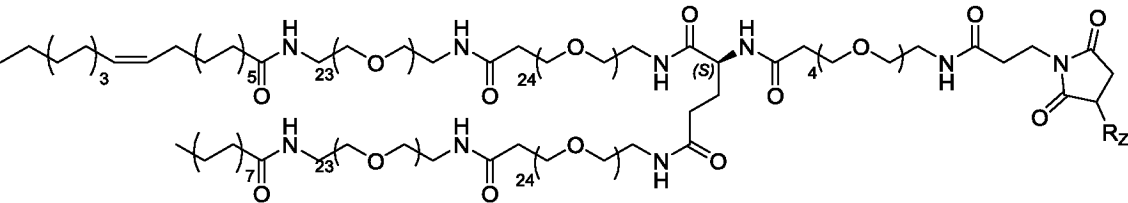
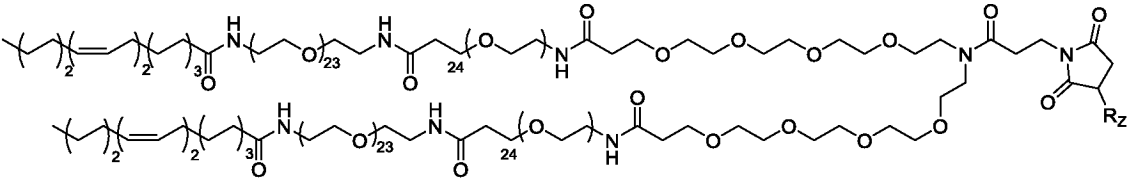
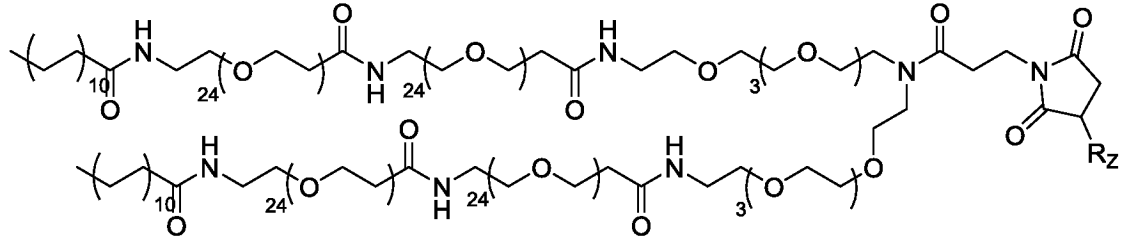
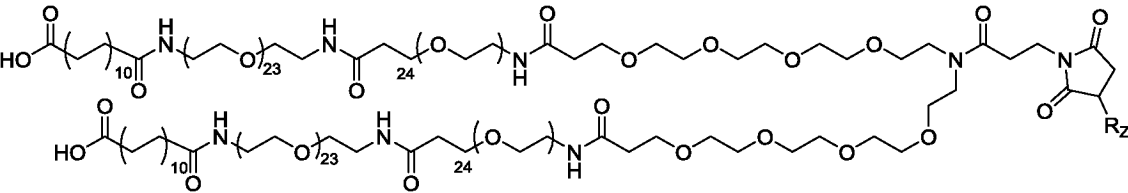
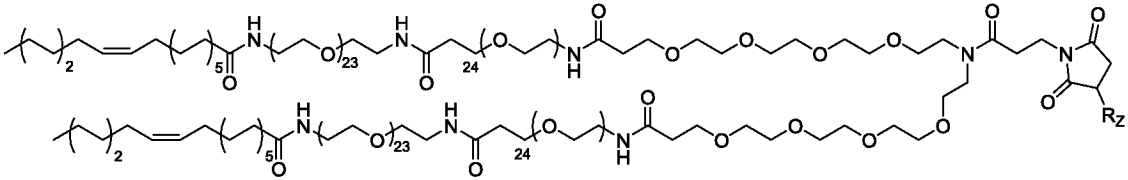
Таблица 6.7

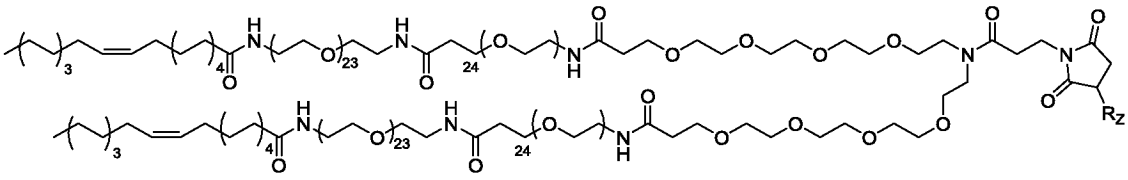
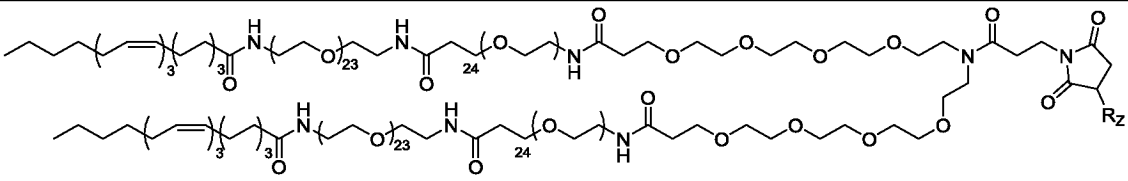
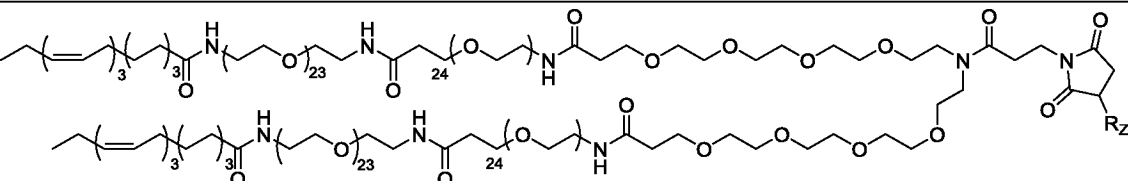
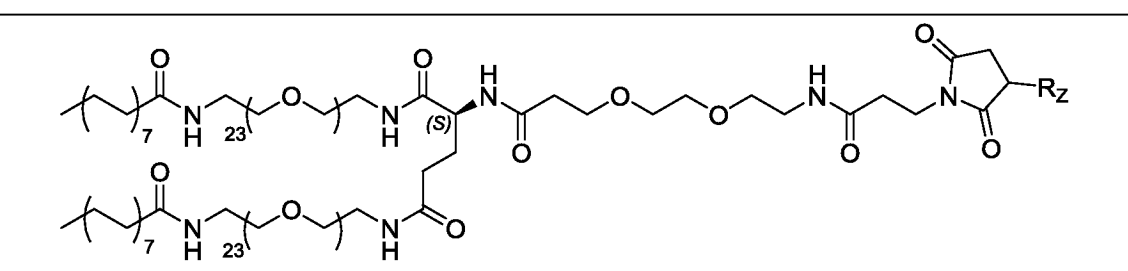
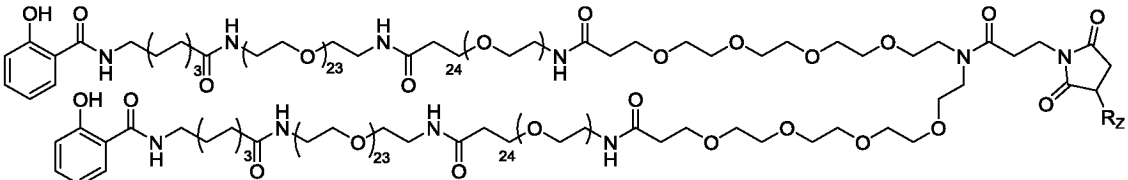
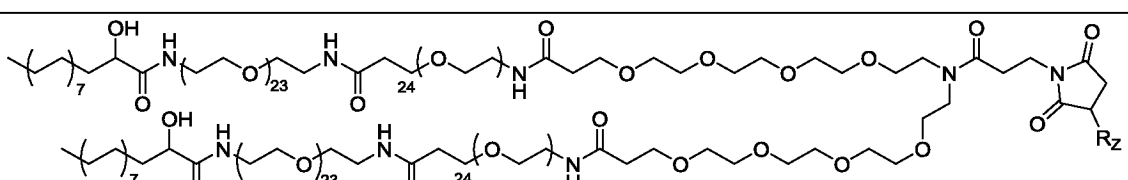
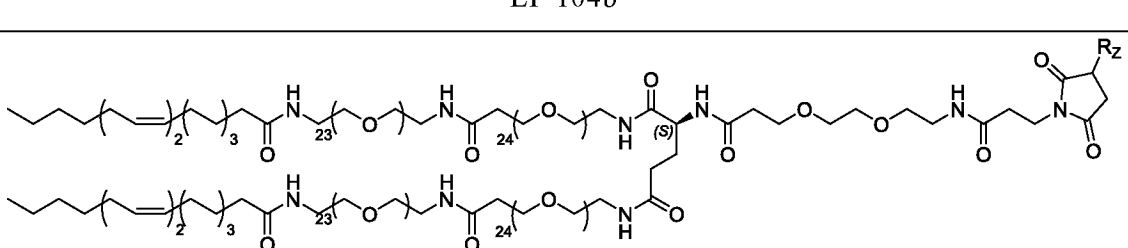
Примеры модуляторов ФК/ФД для применения с агентами РНКи DUX4.

LP 1b
LP 28b
LP 29b
LP 38b
LP 39b
LP 41b

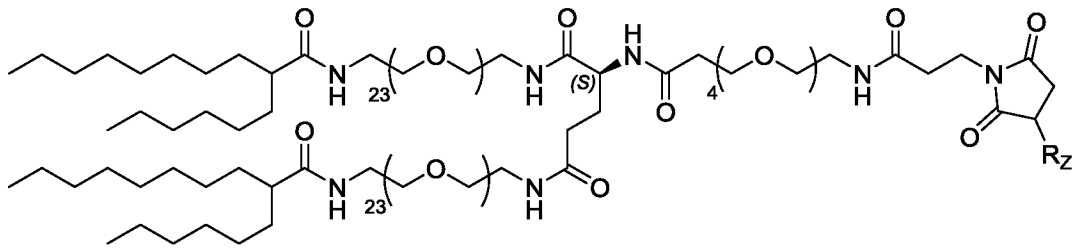
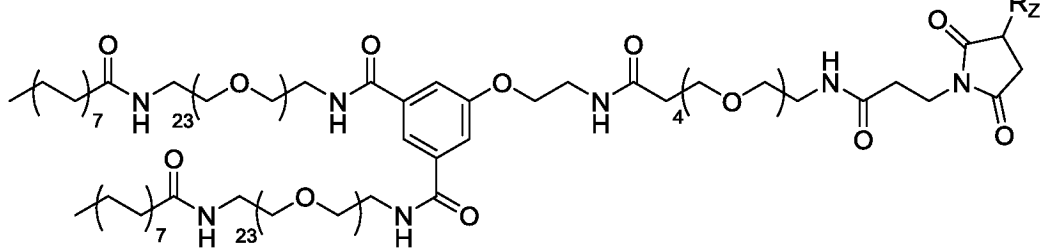
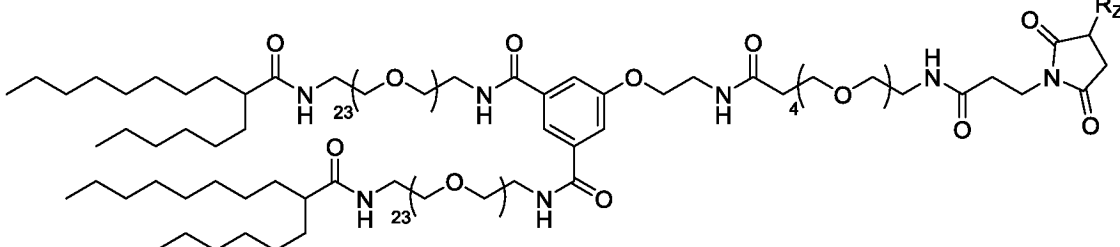
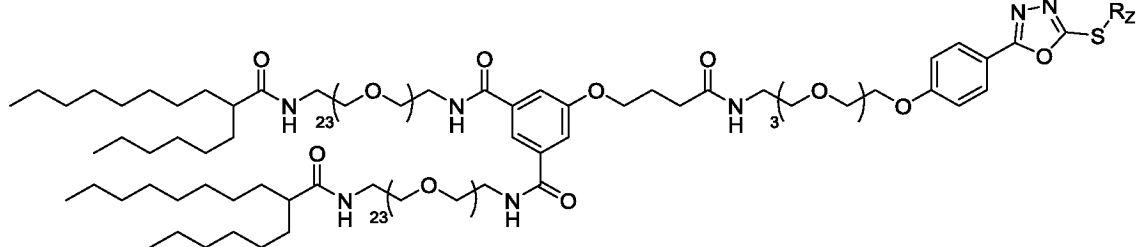
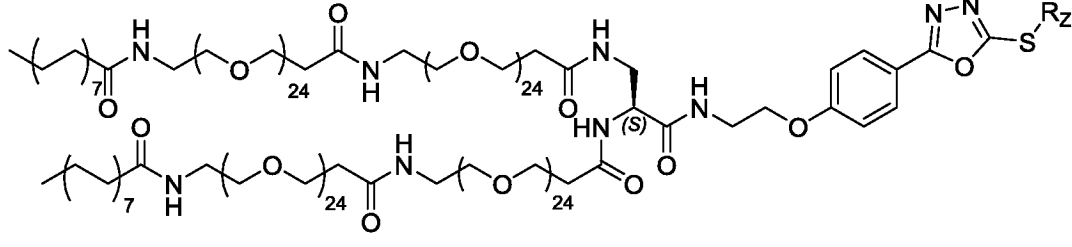
 Chemical structure of LP 42b: A complex molecule featuring a central (S)-chiral center. The structure includes a 7-unit alkyl chain, a 23-unit polyether chain, a 24-unit polyether chain, and a 4-unit polyether chain. The molecule is terminated by a 5-membered cyclic amide (lactam) with an R_Z substituent.
LP 42b
 Chemical structure of LP 43b: A complex molecule featuring a central (S)-chiral center. The structure includes a 7-unit alkyl chain, a 23-unit polyether chain, a 24-unit polyether chain, and an 8-unit polyether chain. The molecule is terminated by a 5-membered cyclic amide (lactam) with an R_Z substituent.
LP 43b
 Chemical structure of LP 44b: A complex molecule featuring a central (S)-chiral center. The structure includes a 7-unit alkyl chain, a 23-unit polyether chain, a 24-unit polyether chain, and a 2-unit polyether chain. The molecule is terminated by a 5-membered cyclic amide (lactam) with an R_Z substituent.
LP 44b
 Chemical structure of LP 45b: A complex molecule featuring a central (S)-chiral center. The structure includes a 7-unit alkyl chain, a 23-unit polyether chain, a 24-unit polyether chain, and a 3-unit polyether chain. The molecule is terminated by a 5-membered cyclic amide (lactam) with an R_Z substituent.
LP 45b
 Chemical structure of LP 47b: A complex molecule featuring a central (S)-chiral center. The structure includes a 7-unit alkyl chain, a 23-unit polyether chain, a 24-unit polyether chain, and a 24-unit polyether chain. The molecule is terminated by a 5-membered cyclic amide (lactam) with an R_Z substituent.
LP 47b

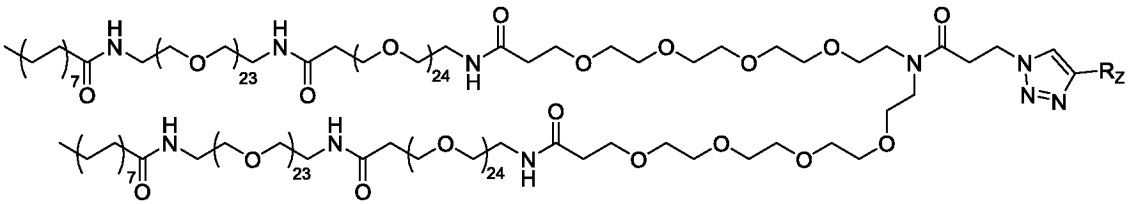
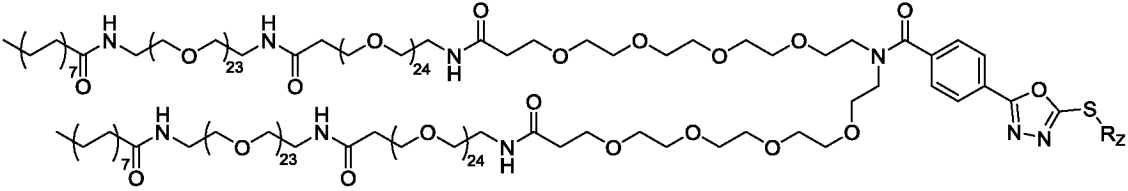
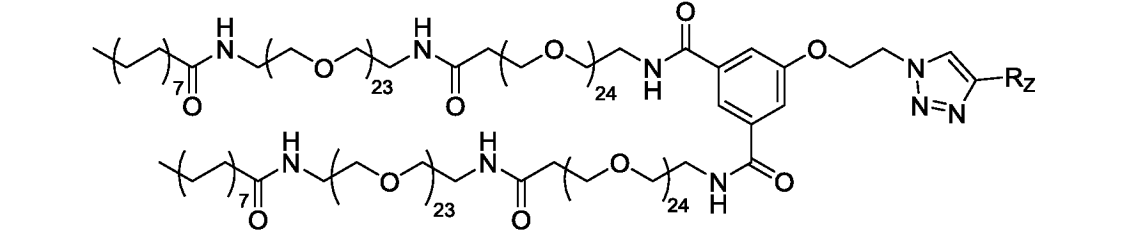
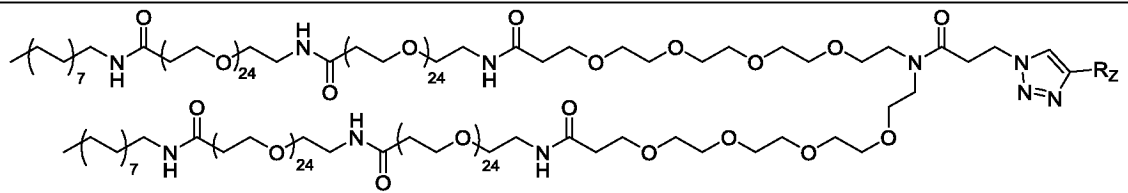
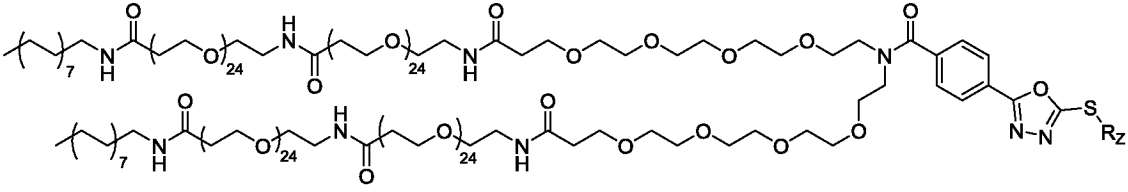
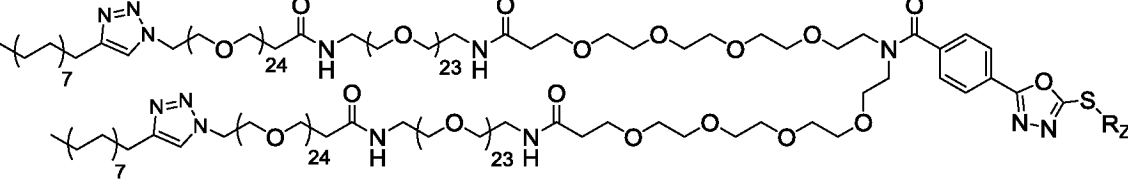
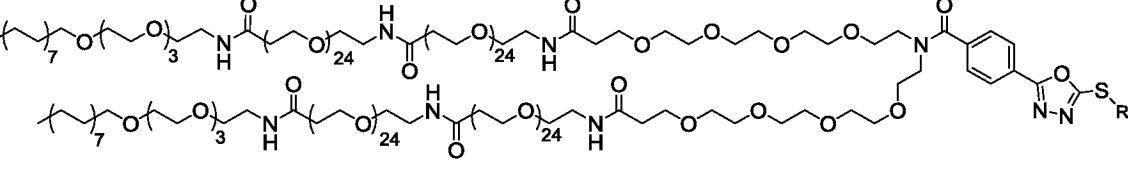

LP 48b

LP 49b

LP 53b

LP 54b

LP 55b

LP 56b

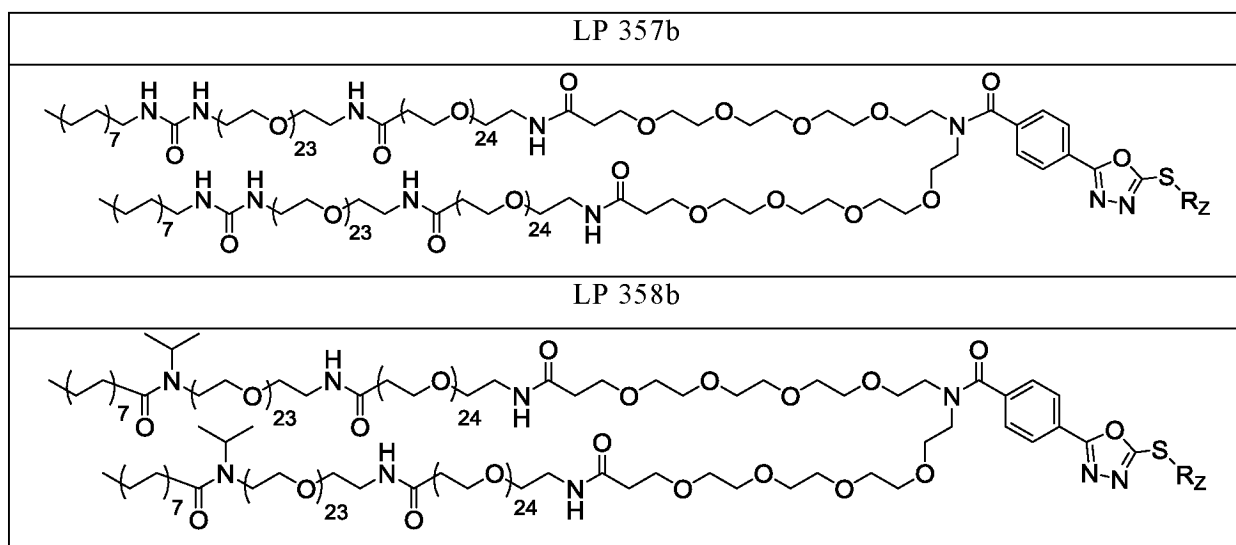

LP 62b

LP 87b

LP 89b

LP 90b

LP 92b

LP 93b


LP 94b

LP 95b

LP 101b

LP 102b

LP 103b

LP 104b


LP 106b
Chemical structure of LP 106b: A linear polymer with two main chains. The top chain consists of a repeating unit of a poly(ether amide) with a 7-unit amide segment and a 23-unit ether segment, followed by a 24-unit amide segment and a 24-unit ether segment. The bottom chain is a similar poly(ether amide) with a 7-unit amide segment and a 23-unit ether segment, followed by a 24-unit amide segment and a 24-unit ether segment. The two chains are linked by a central amide bond. The top chain is further substituted with a side chain containing a 1,2,4-triazole ring, a 3-unit ether segment, and a 4-unit amide segment. The side chain is terminated by a 1,2,4-triazole ring with an R_Z substituent.
LP 107b
Chemical structure of LP 107b: A linear polymer with two main chains. The top chain consists of a repeating unit of a poly(ether amide) with a 7-unit amide segment and a 23-unit ether segment, followed by a 24-unit amide segment and a 24-unit ether segment. The bottom chain is a similar poly(ether amide) with a 7-unit amide segment and a 23-unit ether segment, followed by a 24-unit amide segment and a 24-unit ether segment. The two chains are linked by a central amide bond. The top chain is further substituted with a side chain containing a 1,2,4-triazole ring, a 4-unit ether segment, and a 4-unit amide segment. The side chain is terminated by a 1,2,4-triazole ring with an R_Z substituent.
LP 108b
Chemical structure of LP 108b: A linear polymer with two main chains. The top chain consists of a repeating unit of a poly(ether amide) with a 7-unit amide segment and a 23-unit ether segment, followed by a 24-unit amide segment and a 24-unit ether segment. The bottom chain is a similar poly(ether amide) with a 7-unit amide segment and a 23-unit ether segment, followed by a 24-unit amide segment and a 24-unit ether segment. The two chains are linked by a central amide bond. The top chain is further substituted with a side chain containing a 1,2,4-triazole ring, an 8-unit ether segment, and a 4-unit amide segment. The side chain is terminated by a 1,2,4-triazole ring with an R_Z substituent.
LP 109b
Chemical structure of LP 109b: A linear polymer with two main chains. The top chain consists of a repeating unit of a poly(ether amide) with a 7-unit amide segment and a 23-unit ether segment, followed by a 24-unit amide segment and a 24-unit ether segment. The bottom chain is a similar poly(ether amide) with a 7-unit amide segment and a 23-unit ether segment, followed by a 24-unit amide segment and a 24-unit ether segment. The two chains are linked by a central amide bond. The top chain is further substituted with a side chain containing a 1,2,4-triazole ring, a 12-unit ether segment, and a 4-unit amide segment. The side chain is terminated by a 1,2,4-triazole ring with an R_Z substituent.
LP 110b
Chemical structure of LP 110b: A linear polymer with two main chains. The top chain consists of a repeating unit of a poly(ether amide) with a 7-unit amide segment and a 23-unit ether segment, followed by a 24-unit amide segment and a 24-unit ether segment. The bottom chain is a similar poly(ether amide) with a 7-unit amide segment and a 23-unit ether segment, followed by a 24-unit amide segment and a 24-unit ether segment. The two chains are linked by a central amide bond. The top chain is further substituted with a side chain containing a 1,2,4-triazole ring, a 4-unit ether segment, and a 4-unit amide segment. The side chain is terminated by a 1,2,4-triazole ring with an R_Z substituent.
LP 111b


LP 124b

LP 130b

LP 143b

LP 210b

LP 217b

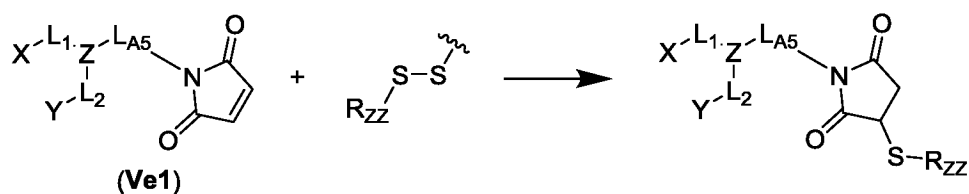

LP 238b

LP 240b

LP 246b

LP 247b

LP 339b

LP 340b




где R_Z содержит агент РНКи DUX4.

В некоторых вариантах агенты РНКи DUX4 могут содержать один или более модуляторов ФК/ФД. В некоторых вариантах агенты РНКи DUX4, раскрытые в данном контексте, содержат один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или более модуляторов ФК/ФД.

Модуляторы ФК/ФД могут являться конъюгированными с агентом РНКи DUX4 с использованием любого известного в данной области техники метода. Многие модуляторы ФК/ФД, в том числе несколько из вышеперечисленных, выпускаются фирмами. В некоторых вариантах несколько соединений, представленных в таблице 6.4, модуляторы ФК/ФД могут включать малеимидный фрагмент и взаимодействовать с агентом РНКи, содержащим дисульфидную связь, с образованием агента РНКи, содержащего модулятор ФК/ФД. Дисульфид можно восстановить и присоединить к малеимиду в результате реакции присоединения Михаэля. Типичная схема реакции показана ниже:

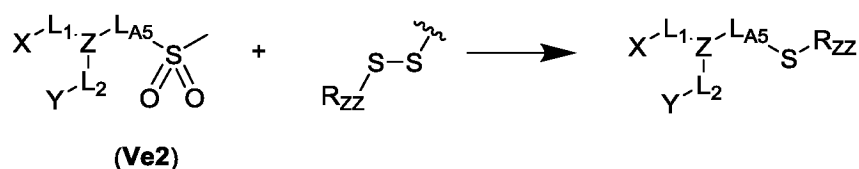


где R_{ZZ} содержит агент РНКи и элемент ~ указывает на место присоединения к любой пригодной группе, известной в данной области техники. В некоторых

вариантах на приведенной выше схеме реакции остаток R_{ZZ} присоединяют к алкильной группе, такой как гексил (C_6H_{13}).

В некоторых вариантах предшественники модуляторов ФК/ФД могут содержать сульфоновую группу и могут взаимодействовать с дисульфидом.

5 Типичная схема реакции показана ниже:



где R_{ZZ} содержит агент РНКи и элемент ~ указывает на место присоединения к любой пригодной группе, известной в данной области техники. В некоторых

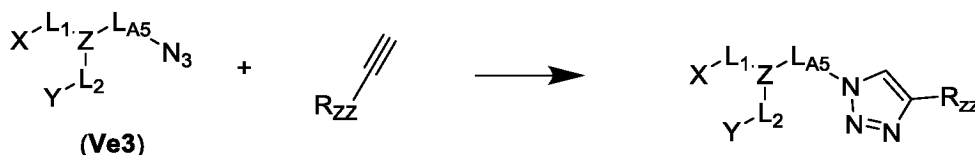
вариантах на приведенной выше схеме реакции остаток R_{ZZ} присоединяют к алкильной группе, такой как гексил (C_6H_{13}).

10

В некоторых вариантах предшественники модулятора ФК/ФД могут содержать азидный фрагмент и вступать в реакцию с агентом РНКи, содержащим алкин, с образованием соединения, содержащего модулятор ФК/ФД, конъюгированный с агентом РНКи, в соответствии с приведенной ниже

15

общей схемой реакции:

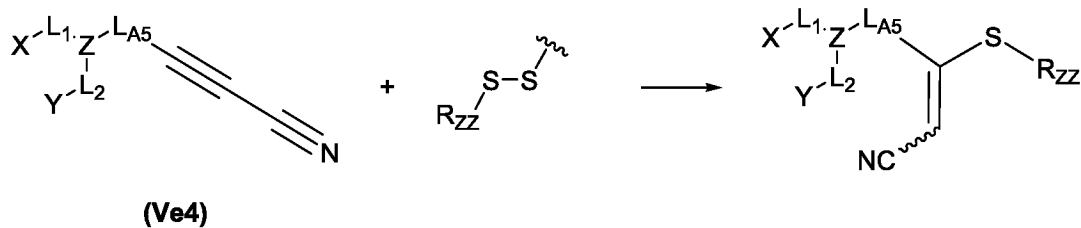


где R_{ZZ} содержит агент РНКи.

В некоторых вариантах предшественники модулятора ФК/ФД могут содержать алкиновый фрагмент и вступать в реакцию с агентом РНКи,

20

содержащим дисульфид, с образованием соединения, содержащего модулятор ФК/ФД, конъюгированный с агентом РНКи, в соответствии с приведенной ниже общей схемой реакции:



где R_{ZZ} содержит агент РНКи, и элемент $\sim$ указывает на место присоединения к любой пригодной группе, известной в данной области техники. В некоторых

вариантах на приведенной выше схеме реакции остаток R_{ZZ} присоединяют к алкильной группе, такой как гексил (C_6H_{13}).

В некоторых вариантах модуляторы ФК/ФД могут являться конъюгированными с 5'-концом смысловой или антисмысловой цепи, 3'-концом смысловой или антисмысловой цепи или с внутренним нуклеотидом агента РНКи DUX4. В некоторых вариантах агент РНКи DUX4 синтезируют с дисульфидсодержащим фрагментом на 3'-конце смысловой цепи, а модулятор ФК/ФД может являться конъюгированным с 3'-концом смысловой цепи в соответствии с показанной выше общей схемой синтеза.

Фармацевтические композиции и составы

Агенты РНКи DUX4, раскрытые в данном контексте, можно получить в виде фармацевтических композиций или составов (также называемых в данном контексте «лекарственными средствами»). В некоторых вариантах фармацевтические композиции включают по меньшей мере один агент РНКи DUX4. Эти фармацевтические композиции прежде всего пригодны для ингибирования экспрессии мРНК DUX4 в клетке-мишени, в группе клеток, в ткани или в организме. Фармацевтические композиции можно использовать для лечения субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или состоянием, при котором было бы полезно снижение уровня содержания мРНК-мишени или ингибирование экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах заболевание, которое необходимо лечить, является FSHD (лице-лопаточно-плечевая-мышечная дистрофия или мышечная дистрофия Ландузи-Дежерина), включая FSHD 1 и FSHD 2. Фармацевтические композиции можно использовать для лечения субъекта из группы риска развития заболевания или расстройства, при котором было бы полезно снижение уровня мРНК-мишени или ингибирование

экспрессии гена-мишени. В одном варианте способ включает введение агента РНКи DUX4, связанного с направляющим лигандом, как описано в данном контексте, субъекту, нуждающемуся в таком лечении. В некоторых вариантах один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов (включая

5 наполнители, носители, разбавители и/или полимеры для доставки) добавляют к фармацевтическим композициям, которые включают агент РНКи DUX4, тем самым формируя фармацевтический состав или лекарственное средство, пригодное для доставки *in vivo* к субъекту, в том числе человеку.

В некоторых вариантах один или более описанных агентов РНКи DUX4

10 вводят млекопитающему в фармацевтически приемлемом носителе или разбавителе. В некоторых вариантах млекопитающее является человеком. Фармацевтические композиции, включающие один или более агентов РНКи DUX4, можно вводить рядом способов в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение. Введение может быть, но не ограничиваясь

15 только этим, например, внутривенным, внутриартериальным, подкожным, внутрибрюшинным, субдермальным (например, через имплантированное устройство) и внутривенным введением.

Фармацевтические композиции, которые включают агент РНКи DUX4, и способы, описанные в данном контексте, снижают уровень мРНК-мишени в

20 клетке, группе клеток, ткани, органе или субъекте, в том числе при введении субъекту терапевтически эффективного количества агента РНКи DUX4, описанного в данном контексте, тем самым ингибируя экспрессию мРНК DUX4 у субъекта. В некоторых вариантах у субъекта ранее было установлено или диагностировано заболевание или нарушение, которое по меньшей мере

25 частично опосредовано экспрессией DUX4. В некоторых вариантах у субъекта ранее было установлено или диагностировано состояние, заболевание или расстройство, при котором было бы полезно снижение уровней белка DUX4 в одной или нескольких клетках или тканях. В некоторых вариантах у субъекта ранее было диагностировано одно или более заболеваний скелетных мышц,

30 таких как FSHD, например, FSHD 1 или FSHD 2. В некоторых вариантах субъект страдал от симптомов, связанных с одним или более заболеваниями скелетных мышц.

В некоторых вариантах описанные фармацевтические композиции, которые включают агент РНКи DUX4, применяют для лечения или контроля клинических

проявлений у субъекта, для которого было бы полезным ингибирование экспрессии DUX4. В некоторых вариантах терапевтически или профилактически эффективное количество одной или более фармацевтических композиций вводят субъекту, нуждающемуся в таком лечении. В некоторых вариантах введение

5 любого из раскрытых агентов РНКи DUX4 можно использовать для уменьшения числа, тяжести и/или частоты симптомов заболевания у субъекта.

Описанные фармацевтические композиции, включающие агент РНКи DUX4, можно использовать для лечения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием или расстройством, при котором было бы

10 полезно снижение или ингибирование экспрессии мРНК DUX4. В некоторых вариантах субъекту вводят терапевтически эффективное количество одной или более фармацевтических композиций, содержащих агент РНКи DUX4, тем самым проводя лечение симптома.

Способ введения представляет собой путь, по которому агент РНКи DUX4

15 приводят в контакт с организмом. Как правило, способы введения лекарственных средств, олигонуклеотидов и нуклеиновых кислот для лечения млекопитающих хорошо известны в данной области техники и могут применяться для введения описанных в данном контексте композиций. Агенты РНКи DUX4, раскрытые в данном контексте, можно вводить любым пригодным

20 способом в составе препарата, соответствующим образом оптимизированным к конкретному способу. В некоторых вариантах фармацевтические композиции можно вводить с использованием инъекции, например, внутривенно, внутримышечно, внутрикожно, подкожно, внутрисуставно или внутрибрюшинно, или местно.

25 Фармацевтические композиции, включающие агент РНКи DUX4, описанный в данном контексте, могут быть доставлены в клетку, группу клеток, ткань или субъекту с использованием технологий доставки олигонуклеотидов, известных в данной области техники. В основном, любой пригодный способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*), признанный в

30 данной области техники, можно оптимизировать для использования с композициями, описанными в данном контексте. Например, доставку можно осуществлять местным введением (например, прямой инъекцией, имплантацией или местным введением), системным введением или подкожным, внутривенным, внутрибрюшинным или парентеральным способом, включая внутрисердечное

(например, внутрижелудочковое, внутривенное и интратекальное), внутримышечное, чрескожное, воздушное (аэрозоль), назальное, пероральное, ректальное или местное (включая трансбуккальное и подъязычное) введение. В некоторых вариантах композиции вводят через подкожную инъекцию, внутримышечную инъекцию или внутривенное введение.

В некоторых вариантах описанные в данном контексте фармацевтические композиции содержат один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов. Описанные в данном контексте фармацевтические композиции получают в виде составов для введения субъекту.

В некоторых вариантах фармацевтические составы, включающие агенты DUX4 РНКи, описанные в данном контексте, пригодные для подкожного или внутривенного введения, можно приготовить в водном натрий-фосфатном буферном растворе (например, агент РНКи DUX4, приготовленный в водных растворах 0,5 мМ однозамещенного фосфата натрия, 0,5 мМ двузамещенного фосфата натрия).

Используемая в данном контексте фармацевтическая композиция или лекарственное средство включает фармакологически эффективное количество по меньшей мере одного из описанных терапевтических соединений и один или более фармацевтически приемлемый эксципиент. Фармацевтически приемлемые эксципиенты представляют собой вещества, отличные от активного фармацевтического ингредиента (API, терапевтический продукт, например, агент DUX4 РНКи), которые преднамеренно включают в систему доставки лекарственного средства. Эксципиенты не оказывают или не предназначены для оказания терапевтического эффекта в предполагаемой дозировке. Эксципиенты могут: а) упростить переработку системы доставки лекарственного средства во время ее получения, б) защищать, поддерживать или повысить стабильность, биодоступность или переносимость пациентом API, в) упростить идентификацию продукта и/или г) улучшать любые другие характеристики общей безопасности, эффективности доставки АФИ во время хранения или применения. Фармацевтически приемлемый эксципиент может являться или не являться инертным веществом.

Эксципиенты включают, но не ограничиваются только ими: усилители абсорбции, антиадгезивы, пеногасители, антиоксиданты, связующие агенты, буферные агенты, носители, агенты для покрытия, красители, усилители

доставки, полимеры доставки, детергенты, декстран, декстозу, разбавители, разрыхлители, эмульгаторы, наполнители, наполнители, ароматизаторы, регуляторы сыпучести, увлажнители, смазывающие вещества, масла, полимеры, консерванты, физиологический раствор, соли, растворители, сахара, 5 поверхностно-активные вещества, суспендирующие агенты, матрицы с замедленным высвобождением, подсластители, загустители, тонизирующие агенты, средства для доставки, гидрофобизаторы и смачивающие агенты.

Фармацевтические композиции, пригодные для инъекций, включают стерильные водные растворы (если они являются водорастворимыми) или 10 дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций по индивидуальному рецепту. Для внутривенного введения пригодные носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor® ELTM (от фирмы BASF, г. Парсиппани, Нью-Джерси) или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Носитель должен 15 быть стабильным в условиях производства и хранения и должен быть защищен от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их пригодные смеси. 20 Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае диспергирования и за счет использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как 25 маннит, сорбит и хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить включением в композицию агента, замедляющего всасывание, например моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций можно приготовить путем введения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий 30 растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают при введении активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из выше перечисленных. В случае стерильных

порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций способы приготовления включают сушку в вакууме и лиофилизацию, при этом получают порошок активного ингредиента в комбинации с любым дополнительным требуемым ингредиентом из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Препараты, пригодные для внутрисуставного введения, можно использовать в форме стерильного водного препарата лекарственного средства, которое может быть представлено в микрокристаллической форме, например, в виде водной микрокристаллической суспензии. Липосомальные составы или биоразлагаемые полимерные системы также можно использовать для введения лекарственного средства как при внутрисуставном, так и при офтальмологическом введении.

Активные соединения можно приготовить в смеси с носителями, которые защищают соединение от быстрого выведения из организма, такими как лекарственная форма с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы для доставки. Можно использовать биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы приготовления таких композиций представляются очевидными специалистам в данной области техники. Липосомальные суспензии также можно использовать в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Их можно приготовить в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, например, как описано в патенте США № 4522811.

Агенты РНКи DUX4 можно изготавливать в виде композиций в виде стандартной лекарственной формы для упрощения введения и единообразия дозировки. Стандартная лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве стандартной формы для субъекта, нуждающегося в лечении, при этом каждая форма содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификацию стандартных лекарственных форм по настоящему изобретению определяют в зависимости от уникальных характеристик активного соединения, и она напрямую зависит от них, и от

достигаемого терапевтического эффекта, а также ограничений, свойственных данной области техники при переработке таких активных соединений для лечения индивидуумов.

5 Фармацевтическая композиция может содержать другие дополнительные компоненты, обычно используемые в фармацевтических композициях. Такие дополнительные компоненты включают, но не ограничиваются только ими: средства против зуда, вяжущие средства, местные анестетики, анальгетики, антигистаминные средства или противовоспалительные средства (например, ацетаминофен, НПВС (нестероидные противовоспалительные), дифенгидрамин и
10 т. д.). Также предполагается, что в качестве «фармацевтических композиций» можно использовать клетки, ткани или изолированные органы, которые экспрессируют или содержат определенные в данном контексте агенты РНКи. Используемые в данном контексте термины «фармакологически эффективное количество», «терапевтически эффективное количество» или просто
15 «эффективное количество» относятся к такому количеству агента РНКи, которое обеспечивает фармакологический, терапевтический или профилактический результат.

В некоторых вариантах способы, раскрытые в данном контексте, дополнительно включают стадию введения второго терапевтического средства
20 или лечения в дополнение к введению агента РНКи, раскрытого в данном контексте. В некоторых вариантах второе терапевтическое средство представляет собой другой агент РНКи DUX4 (например, агент РНКи DUX4, направленный на другую последовательность в пределах мишени-DUX4). В других вариантах второе терапевтическое средство может являться
25 низкомолекулярным препаратом, антителом, фрагментом антитела и/или аптамером.

Как правило, эффективное количество агента РНКи DUX4, описанного в данном контексте, находится в диапазоне от приблизительно 0,0001 до
30 приблизительно 20 мг/кг массы тела/доза, например, от приблизительно 0,5 до приблизительно 10 мг/кг массы тела/доза. Вводимое количество и частота дозировки (например, ежедневно, раз в две недели, еженедельно, ежемесячно, ежеквартально или раз в полгода), вероятно, будут зависеть от таких переменных, как общее состояние здоровья пациента, относительная биологическая эффективность доставляемого соединения, состав препарата,

наличие и типы вспомогательных веществ в составе, а также способ введения. Кроме того, следует понимать, что начальную вводимую дозу можно увеличить выше указанного выше верхнего уровня для быстрого достижения требуемого уровня в крови или ткани, или начальная доза может являться меньше оптимальной.

Для лечения заболевания или для получения лекарственного средства или композиции для лечения заболевания, фармацевтические композиции, описанные в данном контексте, включающие агент РНКи DUX4, можно комбинировать с эксципиентом или вторым терапевтическим агентом или с лечением, включая, но не ограничиваясь только ими: второй или иной агент РНКи, низкомолекулярное лекарственное средство, антитело, фрагмент антитела, пептид и/или аптамер.

Описанные агенты РНКи DUX4 при добавлении к фармацевтически приемлемым эксципиентам или адъювантам можно упаковывать в наборы, контейнеры, упаковки или диспенсеры. Фармацевтические композиции, описанные в данном контексте, можно упаковывать, например, в предварительно заполненные шприцы или флаконы.

Способы лечения и подавления экспрессии

Агенты РНКи DUX4, раскрытые в данном контексте, можно использовать для лечения субъекта (например, человека или другого млекопитающего), страдающего заболеванием или расстройством, при котором было бы полезно введение агента РНКи. В некоторых вариантах агенты РНКи, раскрытые в данном контексте, можно использовать для лечения субъекта (например, человека), у которого было бы полезно снижение и/или ингибирование экспрессии мРНК DUX4.

В некоторых вариантах агенты РНКи, раскрытые в данном контексте, можно использовать для лечения субъекта (например, человека), страдающего заболеванием или расстройством, при котором субъекту будет полезно снижение уровней белка DUX4, включая, но не ограничиваясь только этим, например, при FSHD, включая FSHD 1 и FSHD 2. Лечение субъекта может включать терапевтическое и/или профилактическое лечение. Субъекту вводят терапевтически эффективное количество любого одного или более агентов РНКи DUX4, описанных в данном контексте. Субъектом может являться человек, пациент или человек-пациент. Субъект может представлять собой взрослого,

подростка, ребенка или младенца. Введение фармацевтической композиции, описанной в данном контексте, можно осуществлять человеку или животному.

В некоторых вариантах описанные агенты РНКи DUX4 применяют для лечения по меньшей мере одного симптома, по меньшей мере частично опосредованного уровнями белка DUX4, у субъекта. Субъекту вводят терапевтически эффективное количество любого одного или более описанных агентов РНКи DUX4. В некоторых вариантах субъекту вводят профилактически эффективное количество любого одного или более описанных агентов РНКи, при этом осуществлять лечение субъекта за счет предотвращения или ингибирования по меньшей мере одного симптома.

В некоторых вариантах настоящего изобретения предлагаются способы лечения заболеваний, нарушений, состояний или патологических состояний, по меньшей мере частично опосредованных экспрессией гена DUX4, у нуждающегося в таком лечении пациента, где способы включают введение пациенту любого из агентов РНКи DUX4, описанных в данном контексте.

В некоторых вариантах агенты РНКи DUX4 используют для лечения или контроля клинической картины или патологического состояния у субъекта, при этом клиническая картина или патологическое состояние опосредованы, по меньшей мере, частично экспрессией DUX4. Субъекту вводят терапевтически эффективное количество одного или более агентов РНКи DUX4 или композиций, содержащих агент РНКи DUX4, описанных в данном контексте. В некоторых вариантах способ включает введение композиции, содержащей агент РНКи DUX4, описанный в данном контексте, субъекту, нуждающемуся в таком лечении.

В некоторых вариантах уровень экспрессии гена или уровень мРНК гена *DUX4* в определенных клетках скелетных мышц субъекта, которому вводят описанный агент РНКи DUX4, снижается по меньшей мере приблизительно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25 %, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более 99% по отношению к субъекту до введения агента РНКи DUX4 или к субъекту, которому не вводили агент РНКи DUX4. В некоторых вариантах уровни белка DUX4 у субъекта, которому вводят описанный агент РНКи DUX4, снижены по меньшей мере приблизительно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более 99% ,

по отношению к субъекту до введения агента РНКи DUX4 или к субъекту, которому не вводили агент РНКи DUX4. Уровень экспрессии генов, уровень белка и/или уровень мРНК у субъекта могут снижаться в клетке, группе клеток, ткани и/или другой жидкости субъекта. В некоторых вариантах уровни мРНК DUX4 в определенных клетках скелетных мышц или тканях скелетных мышц у субъекта, которому вводили описанный агент РНКи DUX4, снижены по меньшей мере приблизительно на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% по отношению к субъекту до введения агента РНКи DUX4 или к субъекту, которому не вводили агент РНКи DUX4. В некоторых вариантах уровень белка DUX4 в клетках скелетных мышцах и/или ткани скелетных мышц субъекта, которому был введен описанный агент РНКи DUX4, снижается по меньшей мере приблизительно на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% по отношению к субъекту до введения агента РНКи DUX4 или субъекту, которому не вводили агент РНКи DUX4.

Как указано в данном контексте, уровень белка DUX4 и/или уровень мРНК DUX4 у субъекта может снижаться в клетке, группе клеток, ткани, крови и/или другой жидкости (например, сыворотке) субъекта, как должно быть понятным специалисту в данной области техники. Например, в некоторых вариантах уровень мРНК DUX4 у субъекта, которому был введен описанный агент РНКи DUX4, снижен по меньшей мере приблизительно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35 %, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или более 99% по отношению к субъекту до введения агента РНКи DUX4 или к субъекту, которому не вводили агент РНКи DUX4, в одной или более клетках скелетных мышц или тканях скелетных мышц. В некоторых вариантах уровень мРНК DUX4 и/или белка DUX4 в субпопуляции клеток скелетных мышц субъекта, которому был введен описанный агент РНКи DUX4, снижен по меньшей мере приблизительно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более 99% по отношению к субъекту до введения агента РНКи DUX4 или к субъекту, не получающему агент РНКи DUX4.

В некоторых вариантах агенты РНКи DUX4 могут снижать экспрессию гена *DUX4* в одной или более из следующих мышечных тканей: трехглавая, двуглавая, четырехглавая, икроножная, камбаловидная мышца, жевательная

мышца, EDL (длинный разгибатель пальцев), TA (передняя большеберцовая мышца), трапецевидная мышца и/или диафрагма.

Снижение уровня экспрессии гена, мРНК и белка можно оценить любыми методами, известными в данной области техники. Например, в приведенных в данном контексте примерах описаны соответствующие способы измерения уровней белка DUX4 и уровней мРНК DUX4 у субъекта. Уменьшение или снижение уровня мРНК DUX4 и/или уровней белка DUX4 в совокупности обозначаются в данном контексте как снижение или уменьшение DUX4 или ингибирование или снижение экспрессии гена *DUX4*. Приведенные в данном контексте примеры иллюстрируют известные способы оценки ингибирования экспрессии гена *DUX4*.

Клетки, ткани, органы и не относящиеся к человеку организмы

Рассмотрены клетки, ткани, органы и не относящиеся к человеку организмы, которые включают по меньшей мере один из агентов РНКи DUX4, описанных в данном контексте. Клетку, ткань, орган или не относящийся к человеку организм получают при доставке агента РНКи в клетку, ткань, орган или нечеловеческий организм.

Представленные выше варианты осуществления изобретения и объекты теперь проиллюстрированы в следующих неограничивающих объем изобретения примерах.

Примеры

Пример 1

Синтез агентов РНКи DUX4

Агенты РНКи DUX4, раскрытые в данном контексте, синтезировали, как указано в следующих разделах.

A. Синтез

Смысловые и антисмысловые цепи агентов РНКи DUX4 синтезировали по фосфорамидитной технологии на твердой фазе, используемой в синтезе олигонуклеотидов. В зависимости от масштаба использовали синтезаторы MerMade96E® (от фирмы Bioautomation), MerMade12® (от фирмы Bioautomation) или OP Pilot 100 (от фирмы GE Healthcare). Синтезы выполняли на твердом носителе из макропористого стекла (CPG, 500 Å или 600 Å, полученного от фирмы Prime Synthesis, Астон, Пенсильвания, США). Все фосфорамидиты РНК и 2'-модифицированной РНК получены от фирмы Thermo

Fisher Scientific (Милуоки, Висконсин, США). Прежде всего, использованные 2'-О-метилфосфoramидиты включали следующие: (5'-О-диметокситритил-N⁶-(бензоил)-2'-О-метиладенозин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфoramидит, 5'-О-диметокситритил-N⁴-(ацетил)-2'-О-метилцитидин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфoramидит, (5'-О-диметокситритил-N²-(изобутирил)-2'-О-метилгуанозин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфoramидит и 5'-О-диметокситритил-2'-О-метилуридин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфoramидит. 2'-дезоксидифторфосфoramидиты несли те же защитные группы, что и 2'-О-метилРНК-амидиты. 5'-диметокситритил-2'-О-метиринозин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфoramидиты приобретены у фирмы Glen Research (Вирджиния). Инвертированные с удаленным азотистым основанием (3'-О-диметокситритил-2'-дезоксирибоза-5'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфoramидиты приобретены у фирмы ChemGenes (Уилмингтон, Массачусетс, США). Фосфoramидиты UNA (незаблокированных нуклеиновых кислот – прим. пер.) включали 5'-(4,4'-диметокситритил)-N⁶-(бензоил)-2',3'-секоаденозин, 2'-бензоил-3'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]фосфoramидит, 5'-(4,4'-диметокситритил)-N-ацетил-2',3'-секоцитозин, 2'-бензоил-3'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]фосфoramидит, 5'-(4,4'-диметокситритил)-N-изобутирил-2',3'-секогуанозин, 2'-бензоил-3'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]фосфoramидит и 5'-(4,4'-диметокситритил)-2',3'-секоуридин, 2'-бензоил-3'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]фосфoramидит. Фосфoramидиты циклопропилфосфоната синтезировали в соответствии с международной патентной заявкой № WO 2017/214112 и статьей Erich F. Altenhafer et al., Synthesis of a novel cyclopropyl phosphonate nucleotide as a phosphate mimic, Chemical Communications (June 2021) (DOI: 10.1039 / d1cc02328d). Фосфoramидиты с TFA-амиолинкером также были коммерчески приобретены у фирмы ThermoFisher.

Б. Отщепление и снятие защиты с олигомера, связанного с носителем

После завершения твердофазного синтеза высушенный твердый носитель обрабатывали раствором 40 мас.% метиламина в воде и 28-31% раствором гидроксида аммония (от фирмы Aldrich), 1:1(об./об.), в течение 1,5 ч при 30°C. Раствор выпаривали и твердый остаток вновь растворяли в воде (см. ниже).

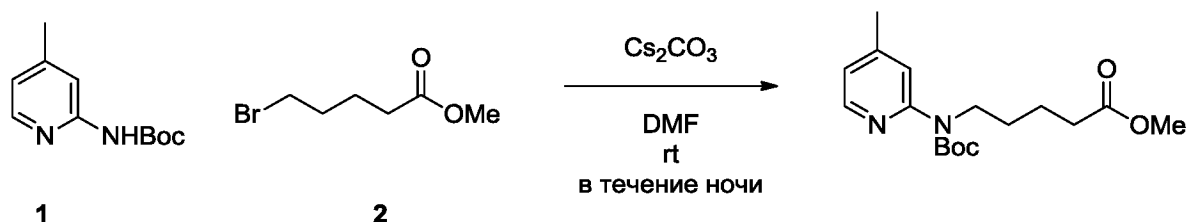
В. Очистка

Неочищенные олигомеры очищали анионообменной ВЭЖХ с использованием колонки TSKgel SuperQ-5PW 13 мкм и системы Shimadzu LC-8. Буферный раствор А представлял собой 20 мМ Трис, 5 мМ ЭДТА, pH 9,0 и содержал 20% ацетонитрила, а буферный раствор В являлся аналогичным буферному раствору А, с добавлением 1,5 М хлорида натрия. Были зарегистрированы следовые количества примесей в УФ при 260 нм. Пригодные фракции объединяли, а затем подвергали эксклюзионной ВЭЖХ на колонке GE Healthcare XK 16/40, заполненной мелкодисперсным сефадексом G25 с использованием подвижного буферного раствора, включающего 100 мМ бикарбоната аммония, pH 6,7 и 20% ацетонитрила или фильтрованную воду. В качестве альтернативы объединенные фракции обессоливали и заменяли пригодным буферным раствором или системой растворителей с помощью фильтрации тангенциальным потоком.

Г. Отжиг

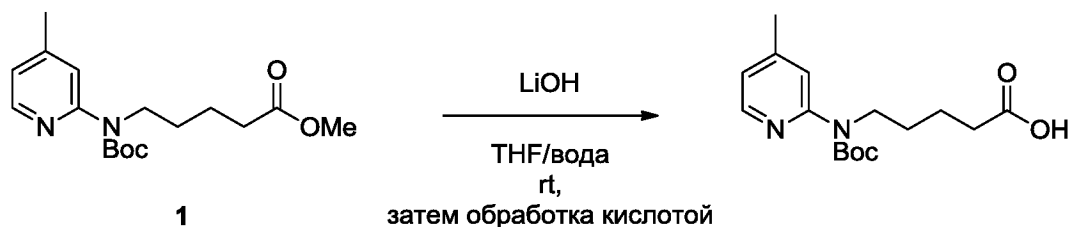
Комплементарные цепи смешивали, объединяя эквимоллярные растворы РНК (смысловой и антисмысловой) в 1× PBS (фосфатно-солевой буферный раствор, 1×, от фирмы Corning, Cellgro) с образованием агентов РНКи. Некоторые агенты РНКи лиофилизировали и хранили при температуре от -15 до -25°C. Концентрацию дуплекса определяли при измерении поглощения раствора на УФ-видимом спектрометре в 1× PBS. Затем поглощение раствора при 260 нм умножали на коэффициент конверсии и коэффициент разбавления для определения концентрации дуплекса. Используемый коэффициент конверсии либо составлял 0,050 мг/(мл·см), либо его определяли экспериментально.

Д. Синтез SM45-р для конъюгации с агентами РНКи: (S)-3-(4-(4-((14-азидо-3,6,9,12-тетраоксатетрадецил)окси)нафталин-1-ил)фенил)-3-(2-(5-((4-метилпиридин-2-ил)амино)пентанамидо)ацетамидо)пропановая кислота

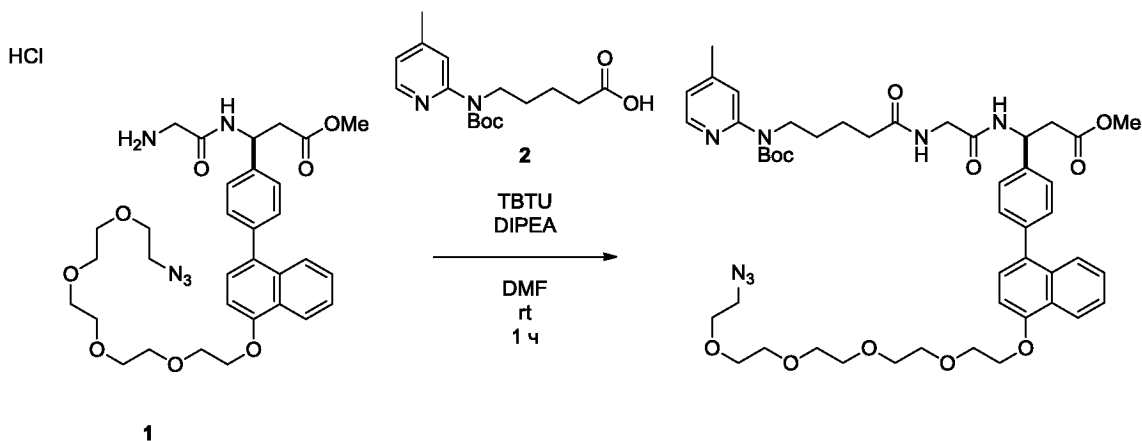


К раствору соединения 1 (0,50 г) в DMF в атмосфере азота (газ) при комнатной температуре добавляли Cs_2CO_3 (0,94 г). Затем медленно по каплям

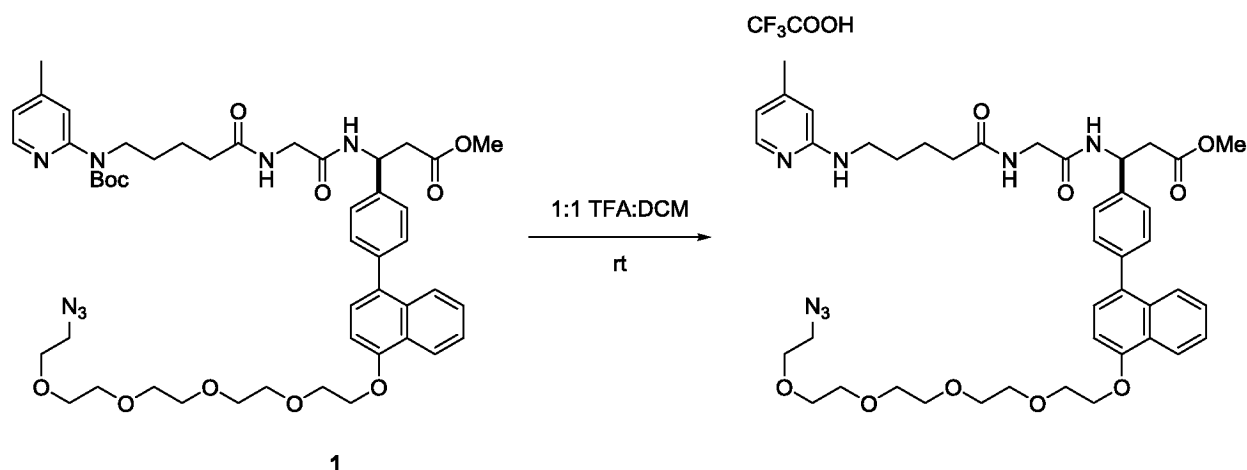
добавляли соединение 2 (0,49 г). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Затем методом ЖХ-МС подтверждали приблизительно 50%-ную конверсию в требуемый продукт. Реакцию останавливали NaHCO_3 (10 мл). Продукт экстрагировали EtOAc (3×15 мл), а затем промывали водой (3×10 мл) и соевым раствором (10 мл). Объединенную органическую фазу сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью системы CombiFlash с использованием силикагеля в качестве стационарной фазы в градиенте от гексана (А) до EtOAc (В) (0-70%), при этом продукт элюировали при 16% В. Продукт концентрировали в вакууме, при этом получали прозрачное масло (0,35 г, выход 45,0%). По данным метода ЖХ-МС расч. $[\text{M}+\text{H}]^+$ составила 323,19 m/z, найд. составила 328,38 m/z.



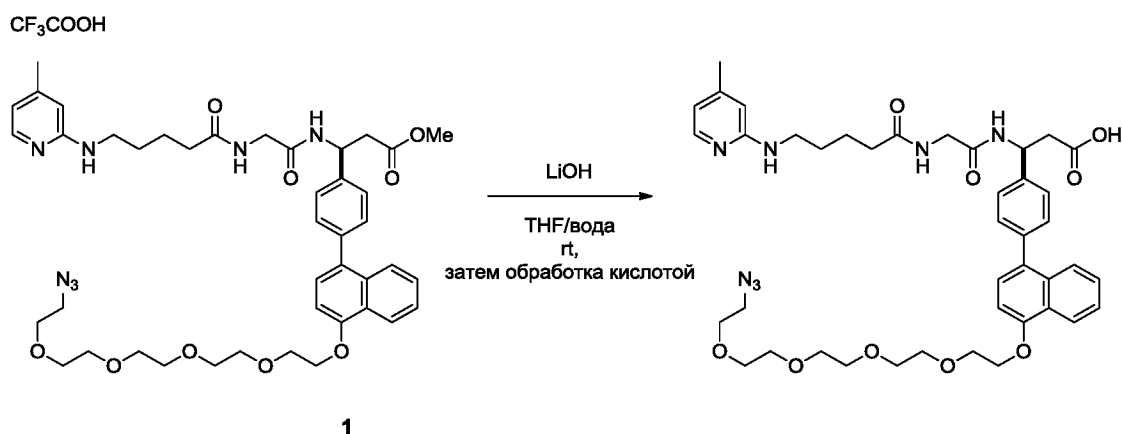
К раствору соединения 1 (0,35 г) в смеси ТГФ/вода, взятых в соотношении 1:1 (об./об.), добавляли LiOH (0,078 г) при комнатной температуре в нормальной атмосфере. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до подтверждения полной конверсии с помощью метода ЖХ-МС. Через 1 ч реакцию смесь подкисляли 6 н. HCl до $\text{pH} \sim 3$. Продукт экстрагировали EtOAc (3×15 мл). Объединенную органическую фазу сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали, получая прозрачное бесцветное масло (0,32 г, выход 94,9%). В выделении не было необходимости. По данным метода ЖХ-МС расч. $[\text{M}+\text{H}]^+$ составила 309,17 m/z, найд. составила 309,24 m/z.



К раствору соединений 1 (0,10 г) и 2 (0,049 г) в DMF добавляли TBUTU (0,058 г), а затем DIPEA (0,079 мл) в условиях окружающей среды. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч, до подтверждения полной конверсии с помощью ЖХ-МС. Затем реакцию останавливали NaHCO_3 (10 мл). Продукт экстрагировали EtOAc (3×15 мл), а затем промывали водой (3×10 мл) и соевым раствором (10 мл). Объединенную органическую фазу сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью системы CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве стационарной фазы с градиентом от DCM (A) до 20% метанола в DCM (B) (0-70%), при этом продукт элюировали при 23% B. Продукт концентрировали в вакууме, его получали в виде прозрачного бесцветного масла (0,088 г, выход 63,6%).

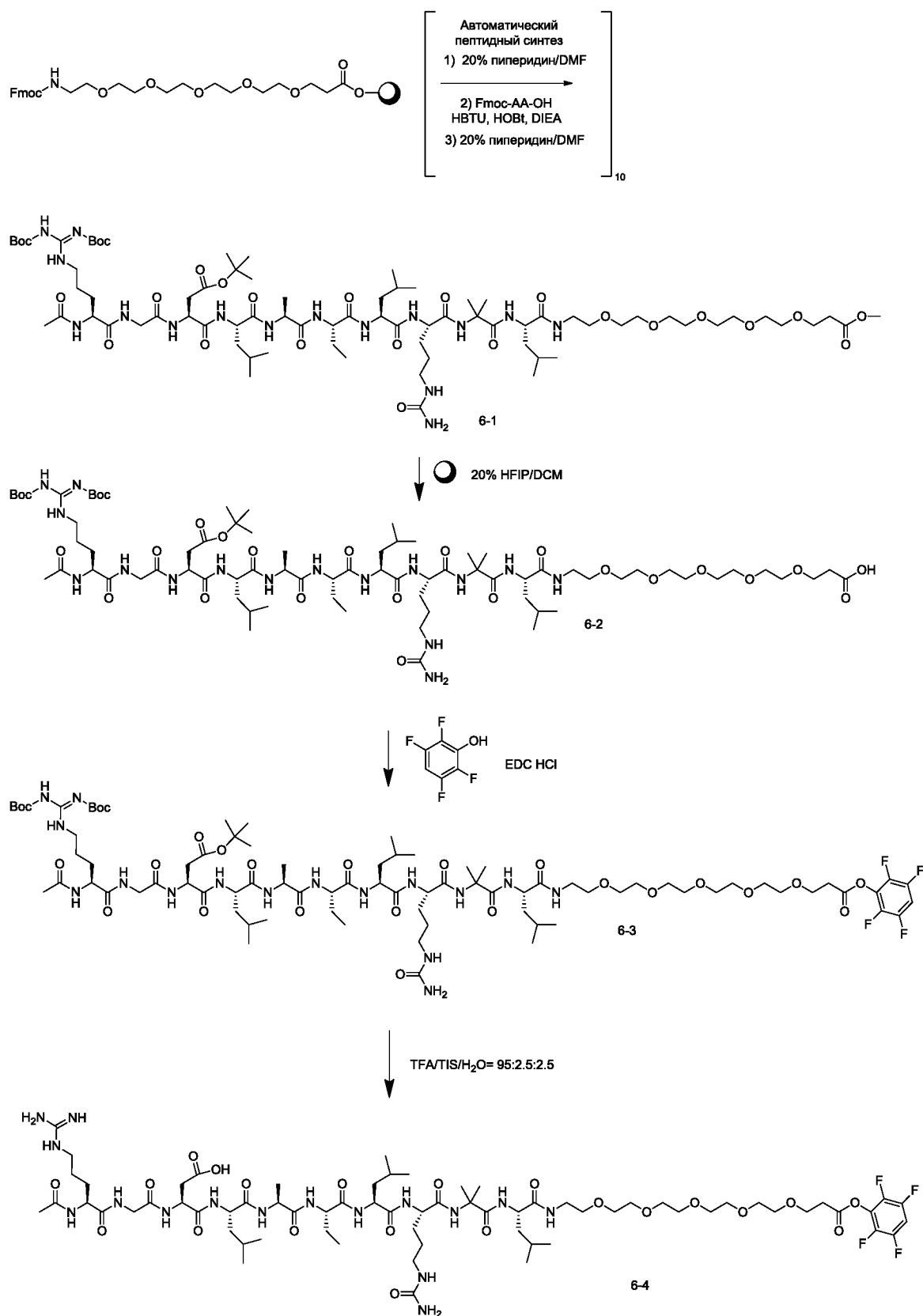


К раствору соединения 1 (0,088 г) в DCM добавляли TFA (0,22 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в условиях окружающей среды. Реакционную смесь перемешивали в течение 5 ч до подтверждения полного превращения методом ЖХ-МС. Реакционную смесь подвергали азеотропной перегонке с PhMe и концентрировали в вакууме. В выделении не было необходимости. Концентрирование обеспечило получение прозрачного бесцветного масла (0,10 г, выход 113%). По данным метода ЖХ-МС расщ. $[\text{M}+\text{H}]^+$ составила 814,41 m/z, наблюдаемая составила 814,63 m/z.



К раствору соединения 1 (0,10 г) в смеси ТГФ/вода, взятых в соотношении 1:1 (об./об.), добавляли LiOH (0,0078 г) при комнатной температуре в нормальной атмосфере. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до подтверждения полной конверсии с помощью ЖХ-МС. Через 4 ч реакционную смесь подкисляли 6 н. HCl до pH ~3. Продукт экстрагировали смесью 20% $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}/\text{DCM}$ (3×15 мл). Объединенную органическую фазу сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали, при этом получали твердое вещество светло-желтого цвета (0,104 г, выход 119%). По данным метода ЖХ-МС расщ. $[\text{M}+\text{H}]^+$ составила 800,39 m/z, найд. составила 800,76 m/z.

Е. Синтез активированного эфира пептида-рецептора клеток скелетных мышц с ($\alpha\gamma\beta 6$ пептид 1) для конъюгации с агентами РНКи



Пептид 1 получали после модификации Arg-Gly-Asp(tBu)-Leu-Ala-Abu-Leu-Cit-Aib-Leu-ПЭГ₅-CO₂-2-Cl-Trt смолы 1, полученной с использованием стандартного Fmoc-метода пептидной химии на пептидном синтезаторе CS Bio с использованием предварительно нагруженной Fmoc-ПЭГ₅-CO₂-H смолы 2-Cl-Trt в концентрации (0,79 ммоль/г) в 4,1 молярном масштабе, как описано выше. После отщепления от смолы пептид 6-2 превращали в тетрафторфениловый эфир 6-3, и неочищенный продукт использовали на следующей стадии без очистки.

Окончательное удаление защитных групп проводили при обработке неочищенного пептида 6-3 смесью для удаления защитных групп TFA/TIS/H₂O = 90:5:5 (80 мл) в течение 1,5 ч. Реакционную смесь по каплям добавляли к метил-трет-бутиловому эфиру (700 мл) и полученный осадок собирали центрифугированием. Осадки дополнительно промывали метил-трет-бутиловым эфиром (500 мл). Остаток очищали методом ОФ-ВЭЖХ (колонка Phenomenex Gemini C18 250 x 50 мм, 10 мкм, 60 мл/мин, градиент 30-45% ацетонитрила в воде, содержащей 0,1% TFA, приблизительно 1 г неочищенного вещества на цикл), при этом получали 4,25 г чистого пептида 6-4.

Ж. Конъюгация направляющих лигандов

Перед отжигом, либо после отжига 5'- или 3'-функционализованную смысловую цепь амина конъюгировали с направляющим лигандом напрямую, либо с помощью линкера, такого как линкер, функционализированный алкином (например, DBCO или линкеры 1-10, как показано в таблице 6.1), который затем можно использовать для ускорения конъюгации с направляющим лигандом(ами).

Ниже в общем виде описана конъюгация линкеров, функционализированных активированным эфиром, включая DBCO и линкеры 1-10, с одноцепочечным или отожженным дуплексом: дуплекс, функционализированный амином, растворяли в смеси 90% DMSO и 10% H₂O при концентрации ~50-70 мг/мл. Добавляли 40 экв. триэтиламина, затем 3 экв. (L4). Ход реакции контролировали с помощью метода ОФ-ВЭЖХ. После завершения конъюгации конъюгат дважды осаждали в системе растворителей 1х фосфатно-солевой буфер/ацетонитрил (при соотношении 1:14) и сушили.

i. Конъюгация направляющих лигандов с пропаргиловыми линкерами

Перед отжигом, либо после отжига 5'- или 3'-тридентатную алкиновую функционализованную смысловую цепь конъюгировали с интегриновыми лигандами бvvб. В следующем примере описывается конъюгация интегриновых

лигандов бvвб с отоженным дуплексом. Исходные растворы 0,5 М трис(3-гидроксипропилтриазилилметил)амин (ТНРТА), 0,5 М пентагидрата сульфата Cu(II) ($\text{Cu(II)SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) и 2М раствор аскорбата натрия готовили в деионизованной воде. Готовили раствор интегринового лиганда бvвб (75 мг/мл) в ДМСО. В центрифужную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую триалкин-функционализированный дуплекс (3 мг, 75 мкл, 40 мг/мл в деионизованной воде, ~15000 г/моль), добавляли 25 мкл 1М Нерес-буфера, pH 8,5. После перемешивания на мешалке вортекс добавляли 35 мкл DMSO и раствор перемешивали. К реакционной смеси добавляли лиганд интегрин бvвб (6 экв/дуплекс, 2 экв/алкин, ~15 мкл) и раствор перемешивали. Измеряли pH с использованием индикаторной бумаги и подтверждали, что pH составляет ~8. В отдельной центрифужной пробирке объемом 1,5 мл смешивали 50 мкл 0,5 М ТНРТА с 10 мкл 0,5 М $\text{Cu(II)SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, перемешивали на мешалке вортекс и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Через 5 мин в реакционный флакон добавляли раствор ТНРТА/Cu (7,2 мкл, 6 экв., соотношение ТНРТА:Cu = 5:1) и перемешивали. Сразу после этого в реакционный флакон добавляли 2М раствор аскорбата (5 мкл, 50 экв. на дуплекс, 16,7 экв. на алкин) и перемешивали. После завершения реакции (обычно в течение 0,5-1 ч) реакционную смесь напрямую очищали методом анионообменной хроматографии в неденатурирующих условиях.

ii. Конъюгация направляющих лигандов со смысловой цепью, функционализированной амином

Следующую процедуру можно использовать для конъюгации активированного функционализованного сложным эфиром направляющего лиганда, такого как пептид 1 бvб, с функционализированным амином агентом РНКи, содержащим амин, такой как C6-NH₂, NH₂-C6 или (NH₂-C6)_s, как указано выше в таблице 6.1.

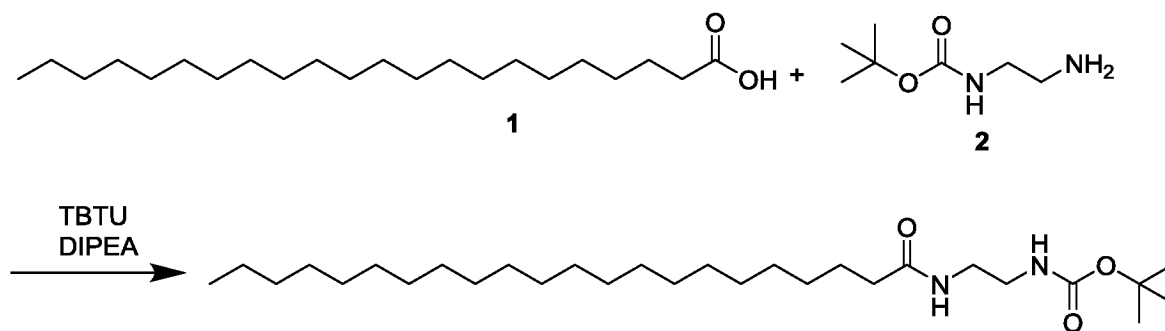
Отоженный лиофилизированный агент РНКи растворяли в смеси DMSO и 10% воды (об./об.) в концентрации 25 мг/мл. Затем к смеси добавляли 50-100 экв. ТЕА и 3 экв. активированного сложного эфира, направленного на лиганд. Реакционную смесь перемешивали в течение 1-2 ч, контролируя ход реакции с помощью метода ОФ-ВЭЖХ-МС (подвижная фаза А: 100 мМ HFIP, 14 мМ ТЕА; подвижная фаза В: ацетонитрил; колонка XBridge C18). После завершения реакции добавляли 12 мл ацетонитрила, затем 0,4 мл PBS и смесь

центрифугировали. Твердый осадок собирали и растворяли в 0,4 мл 1×PBS, а затем добавляли 12 мл ацетонитрила. Полученный осадок собирали и сушили в высоком вакууме в течение 1 ч.

3. Синтез модуляторов ФК/ФД

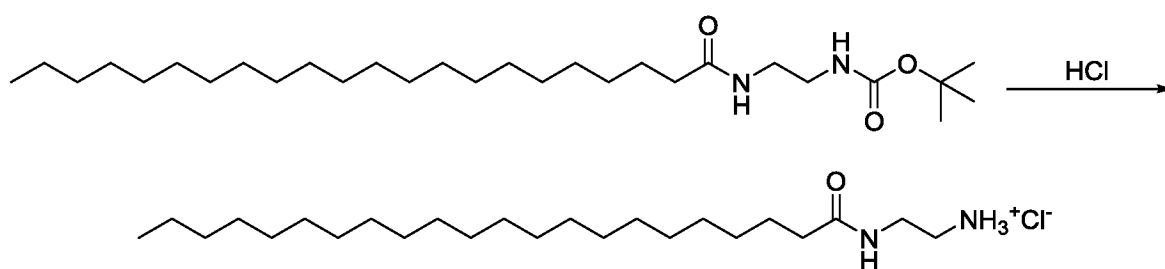
5

Синтез ПЭГ48+С22



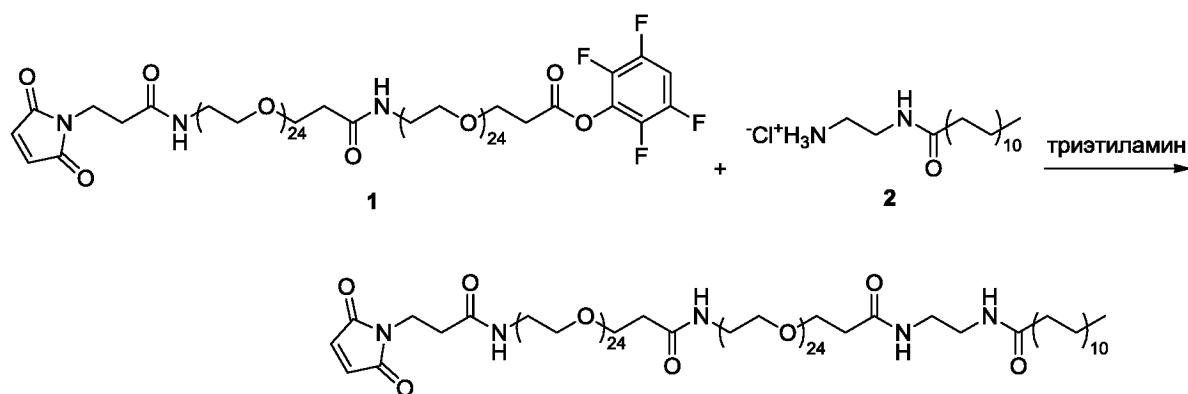
К раствору соединения 1 (350 мг, 1,027 ммоль, 1,0 экв.), соединения 2 (181 мг, 1,130 ммоль, 1,1 экв.) и диизопропилэтиламина (0,537 мл, 3,082 ммоль, 3,0 экв.) в безводном DMF (3 мл) добавляли TBTU (396 мг, 1,233 ммоль, 1,2 экв.) при комнатной температуре. Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакцию останавливали насыщенным водным раствором NaHCO_3 (20 мл) и водный раствор экстрагировали дихлорметаном (3×10 мл). Органическую фазу объединяли, сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали. Продукт очищали с помощью системы CombiFlash® и элюировали 4-5% метанола в дихлорметане. По данным метода ЖХ-МС расщ. $[\text{M}+\text{H}]^+$ составила 483,44, найд. составила 483,67.

15



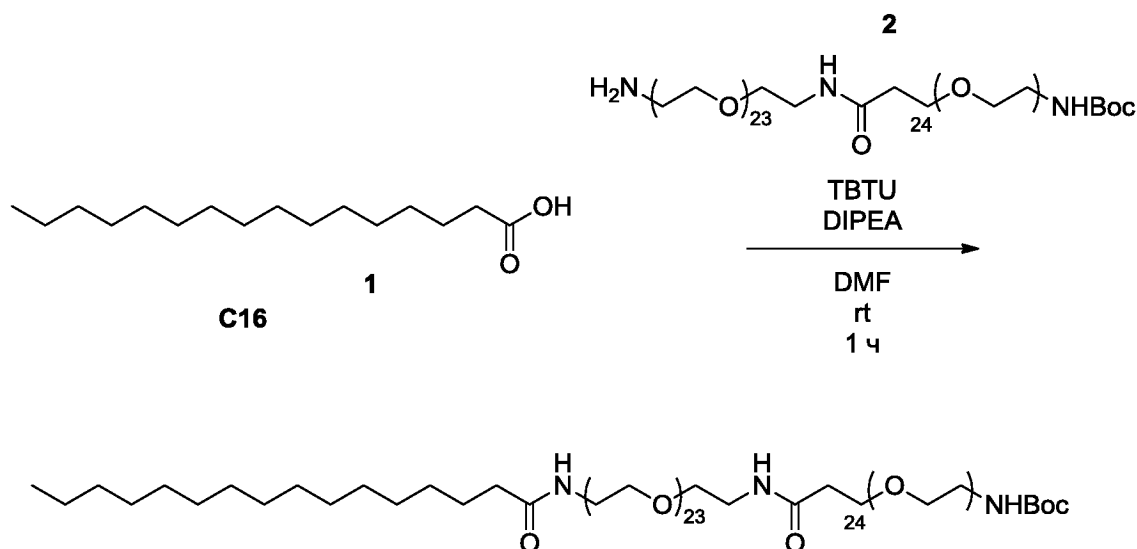
К раствору соединения 1 (290 мг, 0,600 ммоль, 1,0 экв.) в безводном 1,4-диоксане (1 мл) добавляли раствор HCl в диоксане (0,751 мл, 3,003 ммоль, 5,0 экв.) при комнатной температуре. Реакцию выдерживали при комнатной температуре в течение 3 ч и растворитель концентрировали. Продукт использовали напрямую без дополнительной очистки. По данным метода ЖХ-МС: расщ. $[\text{M}+\text{H}]^+$ составила 383,39, найд. составила 383,57.

20



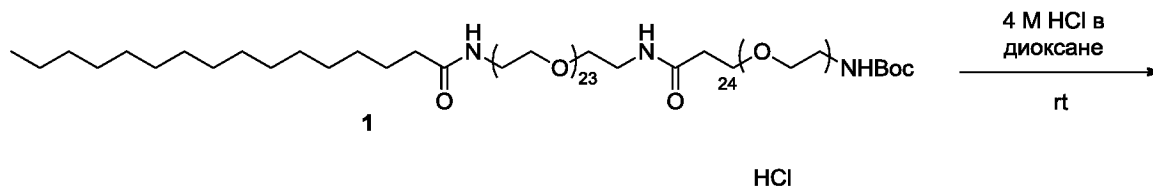
К раствору соединения 1 (83 мг, 0,0322 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 2 (13,5 мг, 0,322 ммоль, 1,0 экв.) в безводном DMF (2 мл) добавляли триэтиламин (0,014 мл, 0,0967 ммоль, 3,0 экв.) при комнатной температуре. Реакцию выдерживали при комнатной температуре в течение 3 ч и растворитель концентрировали. Продукт разделяли с помощью системы CombiFlash и элюировали 10-15% метанола в DCM. По данным ЖХ-МС рассч. $[M+4H]^+/4$ составила 698,18, найд. составила 698,49, рассч. $[M+3H]^+/3$ составила 930,58, найд. составила 930,61.

Синтез LP29-p

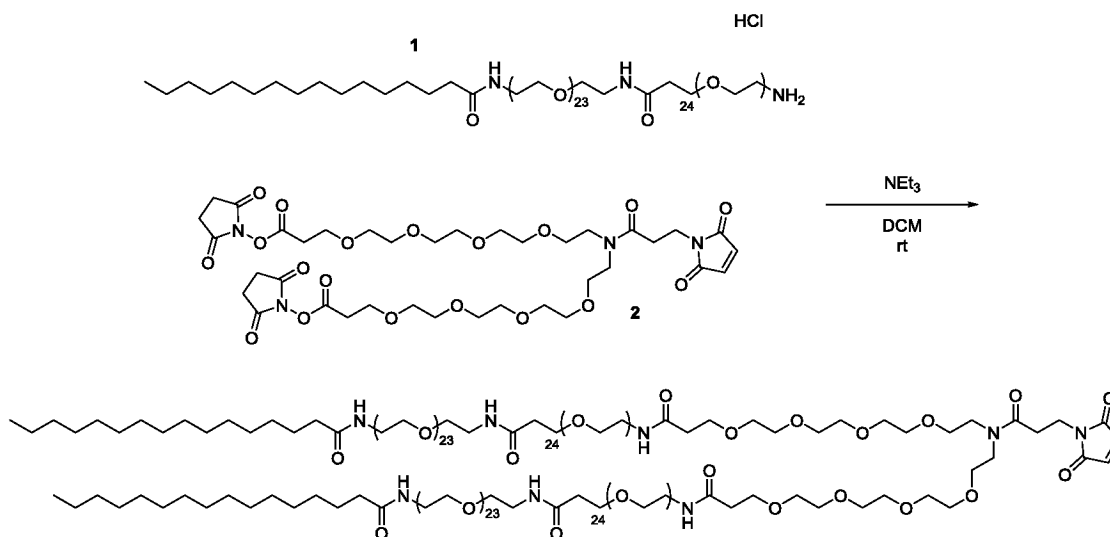


К раствору соединений 1 (40 мг) и 2 (334 мг) в DMF добавляли TBTU (50,1 мг), а затем DIPEA (0,082 мл) в условиях окружающей среды. Реакционную смесь перемешивали до подтверждения полной конверсии методом ЖХ-МС. Затем реакционную смесь немедленно концентрировали для выделения. Остаток очищали с помощью системы CombiFlash с использованием силикагеля в качестве стационарной фазы в градиенте от DCM (A) до 20% метанола в DCM

Продукт концентрировали в вакууме, при этом получали маслянистый остаток белого цвета. По данным ЖХ-МС: расщ. $[M+H]^+$ составила 2539,62 m/z, найд. составила 1288,21 (+2/2, +H₂O) m/z.



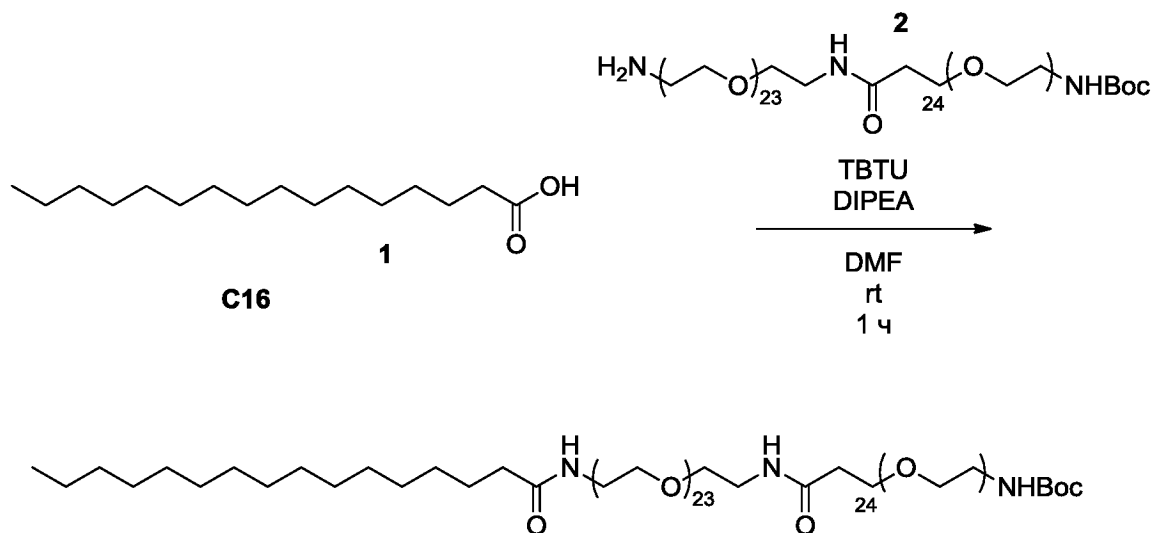
К соединению 1 (147 мг) добавляли смесь 4М HCl в диоксане (21,2 мг) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в условиях окружающей среды. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи до подтверждения полного превращения методом ЖХ-МС. Реакционную смесь подвергали азеотропной перегонке с PhMe и концентрировали в вакууме в течение ночи с получением масла. По данным ЖХ-МС: расщ. $[M+H]^+$ составила 2439,57 m/z, набл. составила 611,16 (+4/4) m/z.



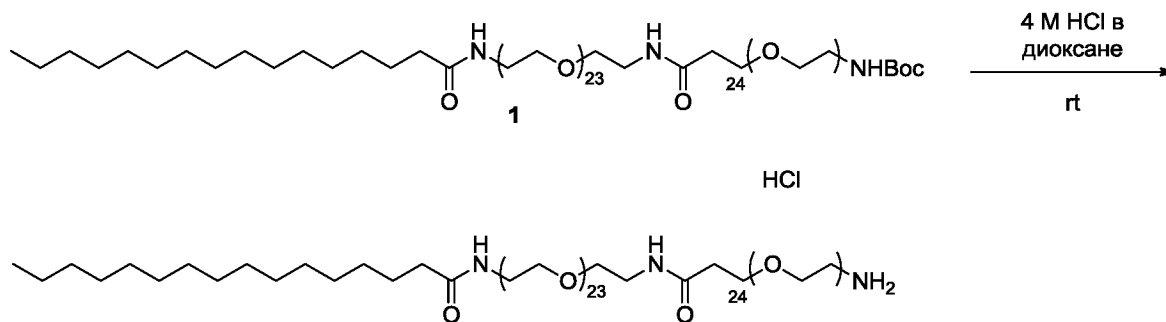
Готовили раствор соединения 1 (143 мг) и NEt_3 (0,024 мл) в безводном DCM и перемешивали в барботируемой азотом атмосфере. Затем к реакционной смеси добавляли соединение 2 (23,4 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до подтверждения полного превращения методом ЖХ-МС.

Реакционную смесь напрямую концентрировали для выделения. Остаток очищали с помощью системы CombiFlash, используя силикагель в качестве стационарной фазы, и элюировали в градиенте от DCM (A) до 20% метанола в DCM (B) (0-100% B). Продукт элюировали при 54% B. По данным метода ЖХ-МС расщ. $[M+H]^+$ составила 5506,42 m/z, найд. составила 1854,41 (+3/3, +H₂O) m/z.

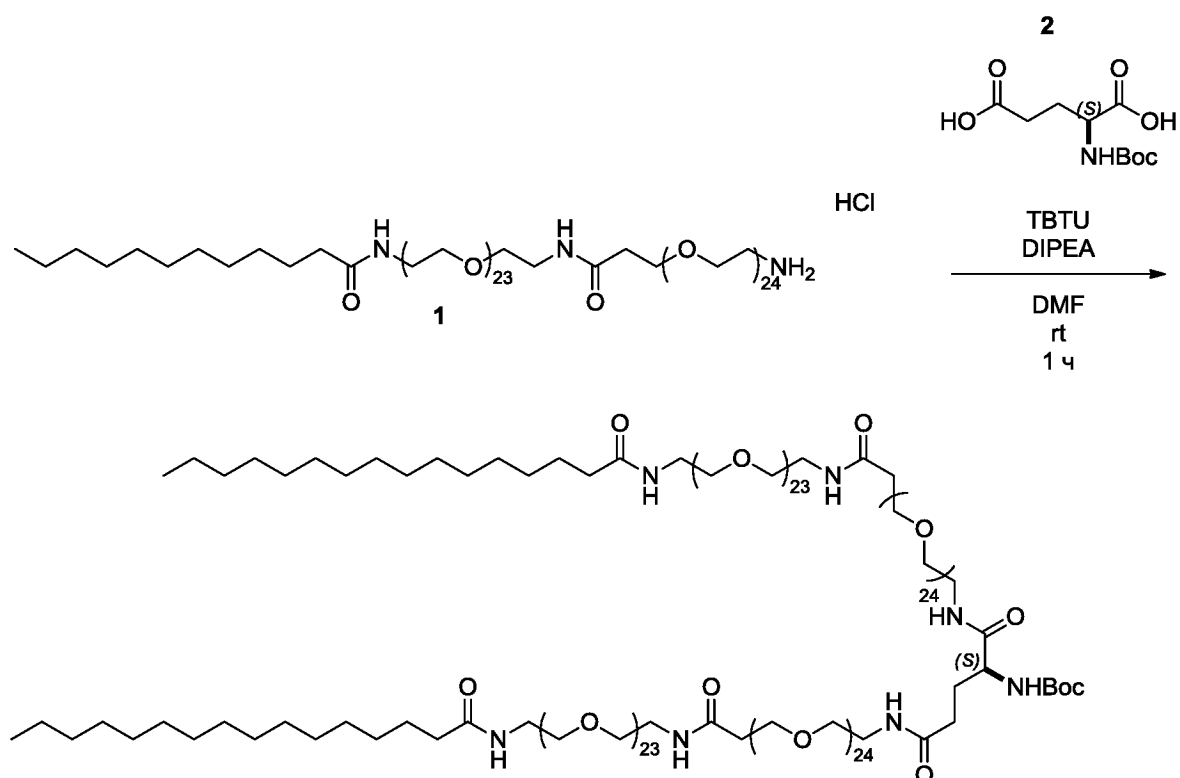
Синтез LP38-p



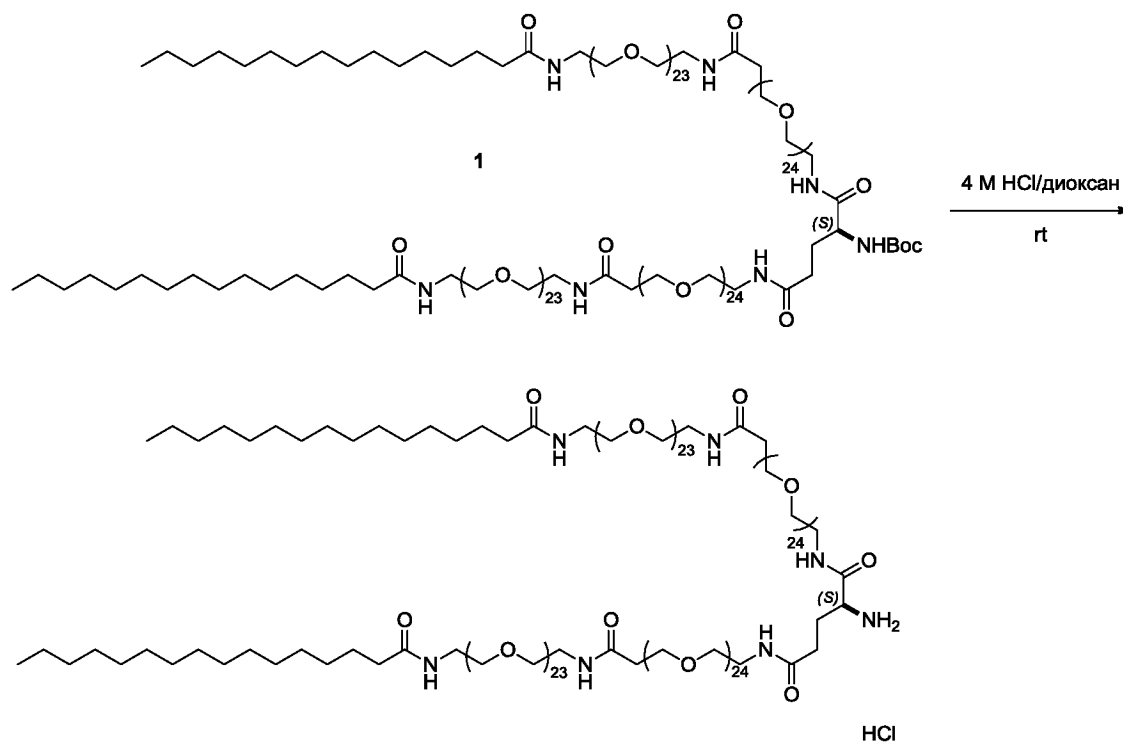
К раствору соединений 1 (35 мг) и 2 (299 мг) в DMF добавляли TBTU (43,8 мг), а затем DIPEA (0,071 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали до полной конверсии, подтвержденной с помощью метода ЖХ-МС. Затем реакционную смесь напрямую концентрировали для выделения. Остаток очищали в системе CombiFlash с использованием силикагеля в качестве стационарной фазы в градиенте от DCM (A) до 20% метанола в DCM (B) (0-100%) в течение 20-30 мин, при этом продукт элюировали при 56% B. Продукт концентрировали в вакууме и получали продукт в виде белого маслянистого остатка. По данным метода ЖХ-МС расщ. $[M+H]^+$ составила 2539,62 m/z, найд. составила 1288,07 (+2/2, +H₂O) m/z.



К соединению 1 (186 мг) добавляли раствор 4М HCl в диоксане (26,7 мг) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи до подтверждения полного превращения с помощью метода ЖХ-МС. Реакционную смесь подвергали азеотропной перегонке в присутствии PhMe и концентрировали в вакууме в течение ночи, при этом получали продукт в виде масла. По данным ЖХ-МС рассч. $[M+H]^+$ составила 2439,57 m/z, найд. составила 1220,97 (+2/2) m/z.

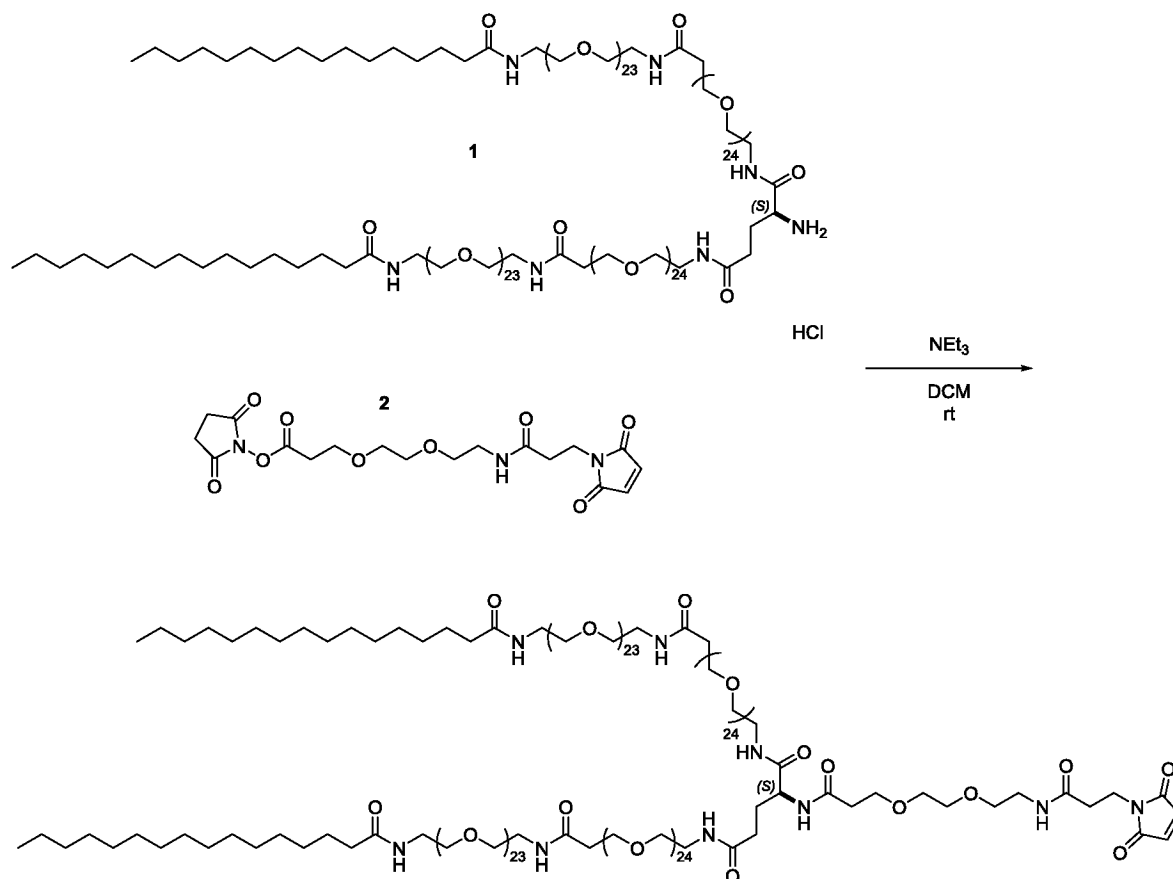


К раствору соединения 1 (181 мг), TBTU (24 мг) и DIEA (0,033 мл) в DMF добавляли соединение 2 (8,7 мг) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали до подтверждения полного превращения с помощью метода ЖХ-МС. Затем реакционную смесь напрямую концентрировали для выделения. Остаток очищали в системе CombiFlash с использованием силикагеля в качестве стационарной фазы в градиенте от DCM (A) до 20% метанола в DCM (B) (0-100%) в течение 20-30 мин, при этом продукт элюировали при 65% B. Продукт концентрировали в вакууме, при этом получали продукт в виде белого маслянистого остатка. По данным ЖХ-МС рассч. $[M+H]^+$ составила 5089,22 m/z, найд. составила 1036,24 (+5/5, +H₂O) m/z.



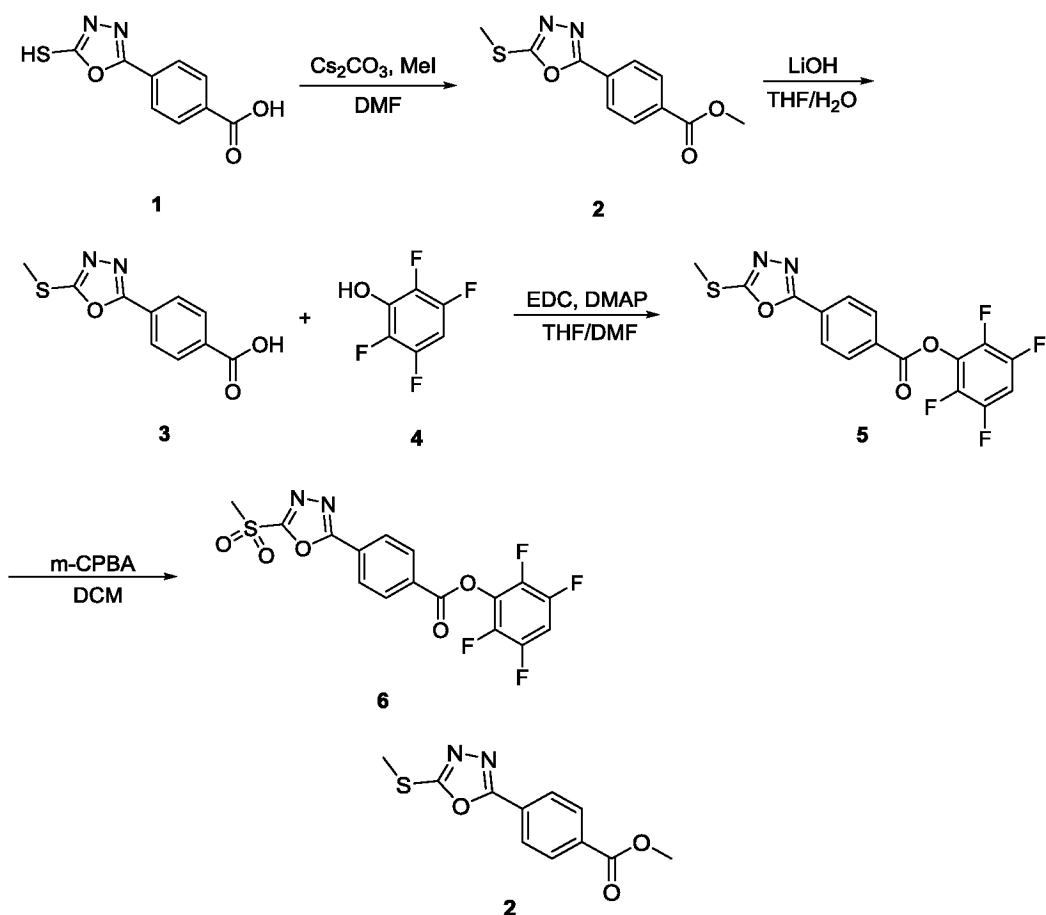
К соединению 1 (130 мг) добавляли раствор 4М HCl в диоксане (9,3 мг) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи до

5 подтверждения полного превращения с помощью метода ЖХ-МС. Реакционную смесь подвергали азеотропной перегонке в присутствии PhMe и концентрировали в вакууме в течение ночи, при этом получали продукт в виде масла. По данным метода ЖХ-МС рассч. $[M+H]^+$ составила 4989,17 m/z, найд. составила 1248,58 (+4/4) m/z.

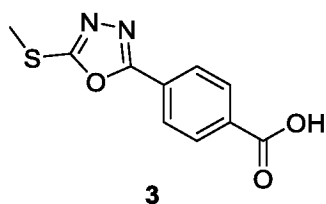


Раствор соединения 1 (128 мг) и NEt₃ (0,018 мл) в безводном DCM при барботировании N₂(газ) готовили при комнатной температуре. Затем медленно добавляли соединение 2 (10,3 мг). Реакционную смесь перемешивали до подтверждения полного превращения с помощью метода ЖХ-МС. Затем реакционную смесь напрямую концентрировали. Остаток очищали в системе CombiFlash с использованием силикагеля в качестве стационарной фазы в градиенте от DCM (A) до 20% метанола в DCM (B) (0-100%) в течение 30 мин, при этом продукт элюировали при 100% B. Продукт концентрировали, при этом получали продукт в виде твердого вещества белого цвета. По данным метода ЖХ-МС расч. [M+H]⁺ составила 5299,28 m/z, найд. составила 1786,62 (+3/3, +H₂O) m/z.

Синтез LP238-p



- 5 К суспензии соединения 1 (5,00 г, 22,50 ммоль) и Cs_2CO_3 (25,66 г, 78,75 ммоль) в безводном DMF (80 мл) добавляли метилйодид (4,20 мл, 67,50 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 48 ч. Реакцию останавливали, добавляя воду (200 мл) и смесь экстрагировали EtOAc (3×100 мл). Органическую фазу объединяли и промывали водой и солевым раствором. Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали. Соединение 2 получали в виде твердого вещества светло-желтого цвета, 5,41 г, с выходом 96%. Соединение 2 использовали непосредственно без дополнительной очистки. По данным ЖХ-МС расщ. $[\text{M}+\text{H}]$ составила 251,05, найд. составила 251,18.



К раствору соединения 2 (5,41 г, 21,62 ммоль) в смеси THF/H₂O (50 мл/50 мл) добавляли LiOH (2,59 г, 108,08 ммоль) при комнатной температуре.

Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч.

После удаления THF в вакууме величину pH доводили до ~2 с помощью HCl

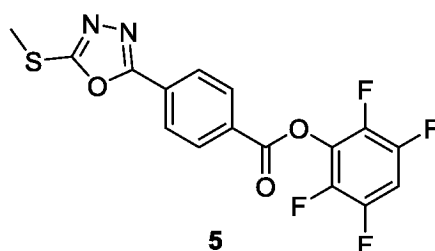
конц. Затем для экстракции использовали EtOAc (3×60 мл). Органические слои объединяли, промывали солевым раствором, затем сушили над безводным

Na₂SO₄ и концентрировали. Соединение 3 получали в виде твердого вещества

грязно-белого цвета, 5 г, с выходом 98%. Соединение 3 использовали

непосредственно без дополнительной очистки. По данным метода ЖХ-МС расщ.

[M+H] составила 237,03, найд. составила 237,26.



К раствору соединения 3 (5,81 г, 24,60 ммоль) в смеси THF с DMF (80 мл/20 мл) добавляли EDC (7,07 г, 36,90 ммоль), DMAP (0,30 г, 2,46 ммоль) и

соединение 4 (6,13 г, 36,90 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную

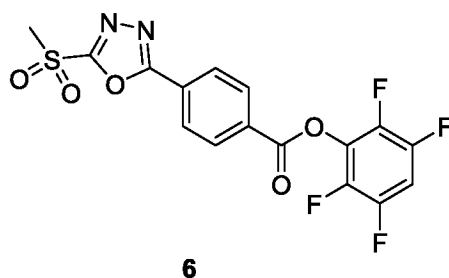
смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После

удаления растворителя в вакууме остаток наносили на 120-граммовую колонку и

соединение 5 элюировали в градиенте 0-50% EtOAc в гексане. Соединение 5

получали в виде твердого вещества белого цвета, 9,36 г, выход составил 99%. По

данным метода ЖХ-МС расщ. [M+H] составила 385,03, найд. составила 385,46.



К раствору соединения 5 (2,29 г, 5,96 ммоль) в DCM (110 мл) добавляли 70% m-CPBA (5,14 г, 27,79 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали

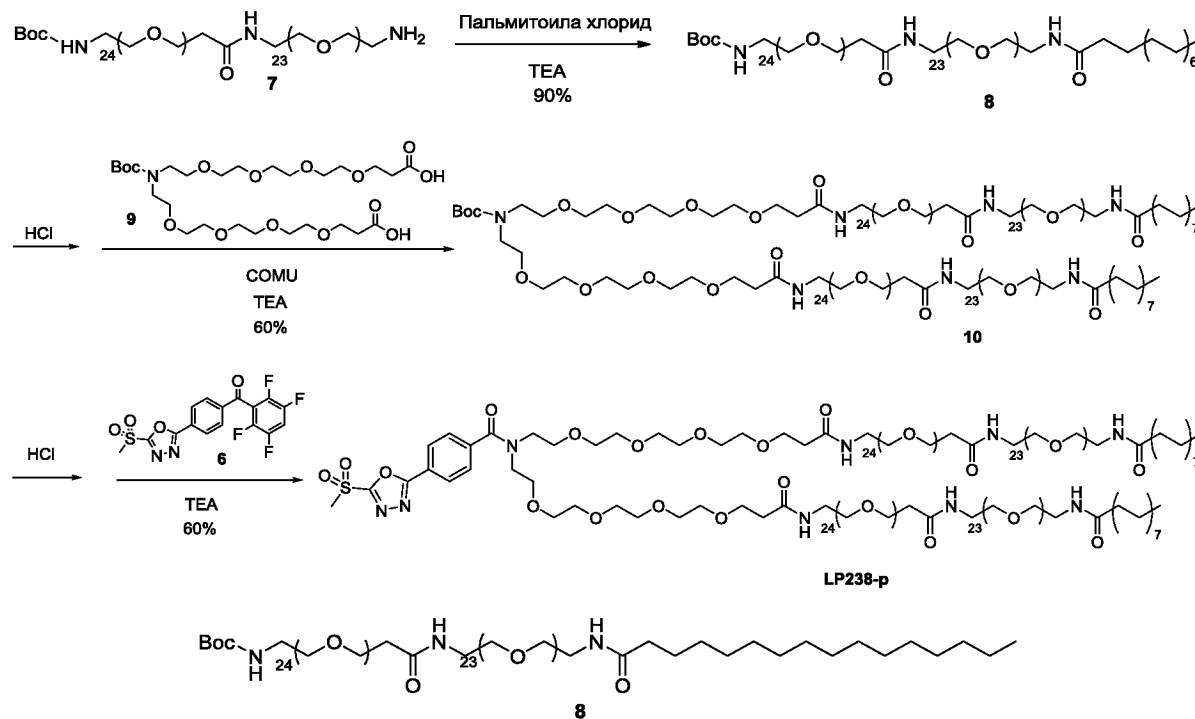
при комнатной температуре в течение 6 ч. Еще одну порцию 1,8 г m-CPBA

добавляли при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при

комнатной температуре в течение ночи. После фильтрации растворитель удаляли

в вакууме. Остаток дважды перекристаллизовывали из смеси DCM с EtOAc (50 мл/50 мл). Соединение 6 получали в виде игольчатых кристаллов белого цвета, 1,93 г, выход составил 78%. По данным метода ЖХ-МС расщ. [M+H] составила 417, найд. составила 417.

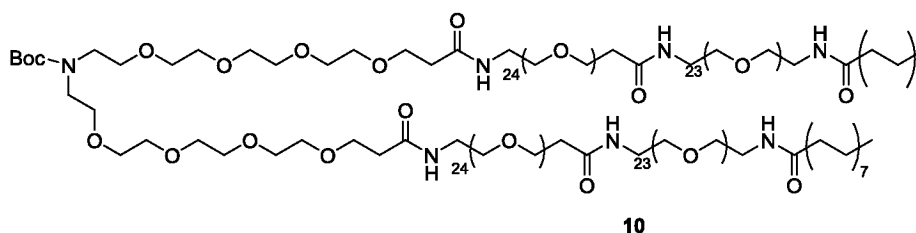
5



10

К раствору соединения 7 (10,00 г, 4,34 ммоль) в DCM (100 мл) добавляли пальмитоилхлорид (1,31 г, 4,78 ммоль) и TEA при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, а затем растворитель удаляли в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле с использованием градиента 0-20% метанола в DCM. Соединение 8 получали в виде твердого вещества белого цвета, 10,0 г, выход составил 90%.

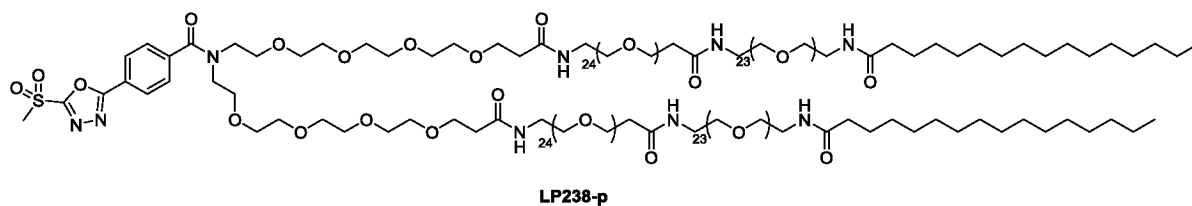
15



20

Соединение 8 (9,56 г, 3,76 ммоль) растворяли в 25 мл смеси 4М HCl в диоксане и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Весь растворитель удаляли и остаток сушили в вакууме в течение 2 ч. Остаток повторно растворяли в 150 мл DCM и добавляли TEA, затем соединение 9 (1,10 г, 1,79 ммоль) и COMU (1,69 г, 3,94 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После стандартной обработки

(раствор 1М HCl, насыщенный бикарбонат, промывка солевым раствором) DCM удаляли. Соединение 10 очищали на 120-граммовой колонке в градиенте 0-20% метанола в DCM, получая 5,90 г вещества с выходом 60%.



- 5 Соединение 10 (4,50 г, 0,82 ммоль) растворяли в 20 мл раствора 4М HCl в диоксане и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Весь растворитель удаляли и остаток сушили в вакууме в течение 2 ч. Остаток повторно растворяли в 100 мл DCM и добавляли TEA, а затем соединение 6 (0,69 г, 1,65 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. TEA удаляли промывкой 1М HCl и органический слой концентрировали. Неочищенный LP238-p очищали хроматографией на силикагеле в градиенте 0-20% метанола в DCM. Получали 2,80 г (выход 60%) LP238-p в виде твердого вещества светло-желтого цвета.

I. Конъюгация модуляторов ФК/ФД с агентами РНКи

- 15 Перед отжигом, либо после отжига, а также перед конъюгацией или после конъюгации одного или более направляющих лигандов один или более предшественников липидных ФК/ФД-модуляторов можно присоединять к агентам РНКи, раскрытым в данном контексте. Ниже приведено общее описание процесса конъюгации, используемого для присоединения предшественников
- 20 липидных модуляторов ФК/ФД к конструктам, изложенным в приведенных в данном контексте примерах.

A. Конъюгация малеимидсодержащего липидного предшественника модулятора ФК/ФД

- Ниже описывается стандартный процесс, используемый для присоединения
- 25 малеимидсодержащего липидного предшественника модулятора ФК/ФД к (C6-SS-C6) или (6-SS-6) функционализированной смысловой цепи агента РНКи с помощью восстановления дисульфида дитиотреитолом с последующей реакцией тиольного присоединения по Михаэлю соответствующего малеимидсодержащего предшественника липидного модулятора ФК/ФД. Во флаконе со
- 30 стерилизованной водой растворяли функционализированную смысловую нить в концентрации 50 мг/мл. Затем добавляли по 20 экв. 0,1М Нерес-буфера, pH 8,5, и

дитиотреитола. Реакцию проводили в течение 1 ч, затем конъюгат осаждали в ацетонитриле и PBS, и твердые вещества центрифугировали, при этом получали осадок.

Осадок помещали в смесь DMSO с водой при соотношении 70:30 при концентрации твердых веществ 30 мг/мл. Затем добавляли малеимидсодержащий липидный предшественник модулятора ФК/ФД в количестве 1,5 экв. Смесь выдерживали в течение 30 мин. Продукт очищали с помощью анионообменной ВЭЖХ (подвижная фаза А: 25 мМ ТРИС, рН 7,2, 1 мМ ЭДТА, 50%-й раствор ацетонитрила; подвижная фаза В: 25 мМ ТРИС, рН 7,2, 1 мМ ЭДТА, 500 мМ NaBr, 50%-й раствор ацетонитрила, твердая фаза - TSKgel-30, 1,5 см x 10 см). Растворитель удаляли на ротормном испарителе и продукт обессоливали на 3К-спин-колонке, промывая стерилизованной водой (2×10 мл). Твердый продукт сушили с помощью лиофилизации и хранили для последующего использования.

Б. Конъюгация сульфосодержащего липидного предшественника модулятора ФК/ФД

Во флаконе со стерилизованной водой растворяли функционализированную смысловую нить в концентрации 50 мг/мл. Затем добавляли по 20 экв. 0,1М Нерес-буферного раствора, рН 8,5, и дитиотреитола. Реакцию проводили в течение 1 ч, затем конъюгат осаждали в ацетонитриле и PBS, и твердые вещества центрифугировали, при этом получали осадок.

Осадок переносили в смесь DMSO с водой в соотношении 70:30 при концентрации твердых веществ 30 мг/мл. Затем добавляли сульфосодержащий липидный предшественник модулятора ФК/ФД в количестве 1,5 экв. Флакон продували N₂ и нагревали до 40°C при перемешивании. Реакцию проводили в течение 1 ч. Продукт очищали с помощью анионообменной ВЭЖХ (подвижная фаза А: 25 мМ ТРИС, рН 7,2, 1 мМ ЭДТА, 50% раствор ацетонитрила; подвижная фаза В: 25 мМ ТРИС, рН 7,2, 1 мМ ЭДТА, 500 мМ NaBr, 50% раствор ацетонитрила, твердая фаза - TSKgel-30, колонка 1,5 см x 10 см) Растворитель удаляли на ротормном испарителе и продукт обессоливали на 3К-спин-колонке, промывая стерилизованной водой (2×10 мл). Твердый продукт лиофилизировали и хранили для последующего использования.

В. Конъюгация азидсодержащего липидного предшественника модулятора ФК/ФД

1 моль.экв. смолы TG-TBTA, с нанесенной Cu(I), взвешивали в стеклянном флаконе. Флакон продували N₂ в течение 15 мин. Затем функционализированную смысловую цепь растворяли в отдельном флаконе в стерилизованной воде в концентрации 100 мг/мл. Затем во флакон добавляли 2 экв. азидсодержащего липидного предшественника модулятора ФК/ФД (50 мг/мл в DMF). Затем добавляли TEA, DMF и воду до достижения конечных условий реакции, при которых состав смеси соответствует 33 mM TEA, 60% DMF и 20 мг/мл конъюгированного продукта. Затем раствор с помощью шприца переносили во флакон со смолой. Продувку азотом прекращали, флакон закрывали и переносили на смеситель при 40°C. Смесь выдерживали для протекания реакции в течение 16 ч. Смолу отфильтровывали с использованием фильтра с диаметром пор 0,45 мкм.

Продукт очищали с помощью анионообменной хроматографии (подвижная фаза А: 25 mM Трис, pH 7,2, 1 mM EDTA, 50% ацетонитрила; подвижная фаза В: 25 mM Трис, pH 7,2, 1 mM EDTA, 500 mM NaBr, 50% ацетонитрила, твердая фаза - TSKgel-30, колонка 1,5 см x 10 см.) Ацетонитрил удаляли на роторном испарителе и продукт обессоливали на 3К-спин-колонке, промывая стерилизованной водой (2×10 мл). Твердый продукт лиофилизировали и хранили для последующего использования.

Г. Конъюгация алкинсодержащего липидного предшественника модулятора ФК/ФД

Ниже описывается стандартный процесс, используемый для присоединения активированного алкинсодержащего липидного предшественника модулятора ФК/ФД к (C6-SS-C6) или (6-SS-6) функционализированной смысловой цепи агента РНКи в результате восстановления дисульфида дитиотреитолом с последующим добавлением к алкинсодержащему предшественнику модулятора ФК/ФД. Во флаконе со стерилизованной водой растворяли 10 мг siRNA, содержащей функционализированную смысловую цепь, включающую связи (C6-SS-C6) или (6-SS-6), в концентрации 50 мг/мл. Затем добавляли по 20 экв. 0,1 M Hepes-буферного раствора, pH 8,5 и дитиотреитола (1M в стерилизованной воде). Реакцию проводили в течение 1 ч, затем очищали на колонке XBridge BEH C4, используя подвижную фазу А(100 mM HFIP, 14 mM и TEA), и подвижную фазу В

(ацетонитрил), в соответствии со следующей схемой, где %В указывает количество подвижной фазы В, а остальную часть составляет подвижная фаза А.

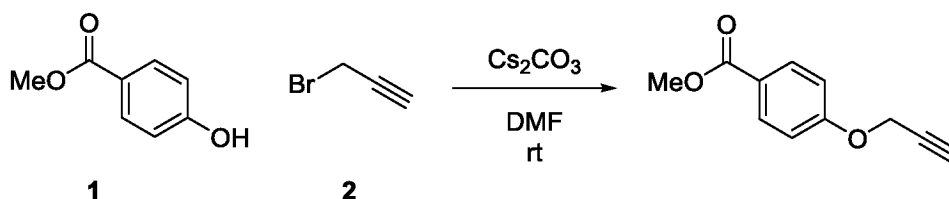
Время	% В
0	3
8	70
10	90
11	90
11.1	3
13	3

Продукт осаждали один раз, добавляя 12 мл ацетонитрила и 0,4 мл 1XPBS, и полученное твердое вещество центрифугировали, при этом получали осадок. Осадок повторно растворяли в 0,4 мл 1XPBS и 12 мл ацетонитрила. Осадок сушили в высоком вакууме в течение 1 ч.

Осадок вносили во флакон со смесью DMSO с водой (70/30, об./об.) при концентрации твердых веществ 30 мг/мл. Затем добавляли алкинсодержащий липидный предшественник модулятора ФК/ФД в количестве 2 экв. по отношению к siRNA. Затем добавляли 10 экв. TEA. Флакон продували азотом и реакционную смесь нагревали до 40°C при перемешивании. Реакцию проводили в течение 1 ч. Продукт очищали с помощью анионообменной ВЭЖХ с использованием набивной колонки TSKgel-30, 1,5 см x 10 см, с использованием подвижной фазы А (25 мМ Трис, pH 7,2, 1 мМ ЭДТА, 50% ацетонитрила) и подвижной фазы В (25 мМ Трис, pH 7,2, 1 мМ ЭДТА, 500 мМ NaBr, 50 % ацетонитрила), в соответствии со следующей схемой, где %В указывает количество подвижной фазы В, а остаток — подвижной фазы А.

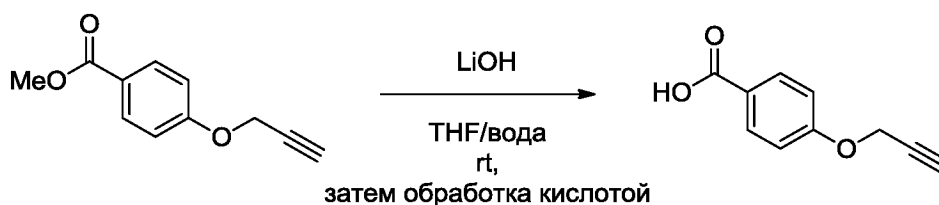
Время	% В
4	10
7	80
10.5	80
11	10
14	10

Собирали фракции, содержащие продукт, и удаляли ацетонитрил с помощью ротормного испарителя. Продукт обессоливали на 3К-спин-колонке, промывая стерилизованной водой (2 x 10 мл). Затем продукт сушили с помощью лиофилизации и хранили для последующего использования.

К. Синтез линкера 4

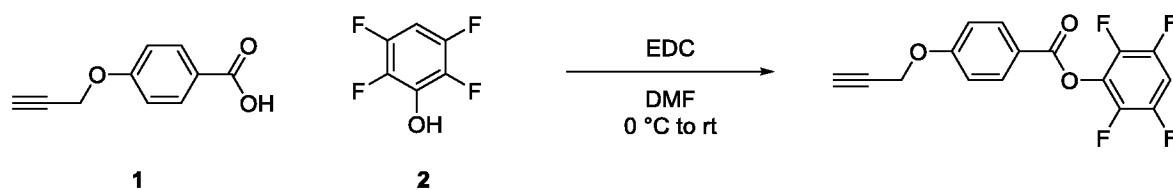
К раствору соединения 1 (3,00 г) в DMF добавляли Cs_2CO_3 (7,71 г) при комнатной температуре. Затем медленно добавляли соединение 2 (1,85 мл).

- 5 Реакционную смесь перемешивали в течение ночи в атмосфере N_2 (газ). Затем с помощью метода ЖХ-МС подтверждали почти полное превращение в требуемый продукт. Реакцию останавливали, добавляя NaHCO_3 (10 мл). Продукт экстрагировали EtOAc (5×10 мл) и затем промывали водой (3×8 мл) и соевым раствором (8 мл). Объединенную органическую фазу сушили над Na_2SO_4 ,
- 10 фильтровали и концентрировали. Остаток очищали в системе CombiFlash с использованием силикагеля в качестве стационарной фазы в градиенте: гексан (А) - EtOAc (В) (0-30%), при этом продукт элюировали при 14% В. Продукт концентрировали в вакууме и получали твердое вещество белого цвета. По данным метода ЖХ-МС: расщ. $[\text{M}+\text{H}]^+$ составила 191,06 m/z, найд. составила
- 15 191,23 m/z.



- К раствору соединения 1 (2,87 г) в смеси THF с водой (1:1) добавляли LiOH (1,08 г) при комнатной температуре в нормальной атмосфере. Реакционную смесь перемешивали до подтверждения полного превращения с помощью метода
- 20 ЖХ-МС. Остаточный исходный материал экстрагировали с помощью EtOAc , а затем водную фазу подкисляли 6N HCl до pH ~3. Продукт выпадал в виде твердого вещества белого цвета, его фильтровали в вакууме и промывали водой. Из-за влажности/липкости твердого вещества в круглодонную колбу для его переноса требовался растворитель; материал переносили с использованием
- 25 метанола и DCM. Из-за низкой растворимости как в индивидуальных растворителях, так и в их смеси материал был непригоден для сушки над Na_2SO_4 и, соответственно, его концентрировали в вакууме, при этом получали

кристаллического рыхлого твердого вещества белого цвета. В дополнительной очистке не было необходимости. По данным метода ЖХ-МС: расщ. $[M+H]^+$ составила 177,05 m/z, найд. составила 177,19 m/z.



- 5 К раствору соединений 1 (1,00 г) и 2 (1,04 г) в DMF (10,0 мл) в атмосфере N_2 (газ) добавляли EDC (1,20 г) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали до подтверждения полного превращения методом ЖХ-МС. Из-за
- 10 невозможности результативно определить наличие продукта после перемешивания в течение ночи реакцию останавливали, добавляя $NaHCO_3$, что
- 15 приводило к осаждению. С помощью метода ЖХ-МС подтверждали, что осадок содержит исходные вещества, осадок фильтровали в вакууме, предпринимали попытку ресуспендировать осадок в смеси метанола с DCM, а затем концентрировали в вакууме. Затем смесь снова растворяли в DMF, сушили над Na_2SO_4 и фильтровали в вакууме, промывая DMF. К фильтрату (реакционная
- 20 смесь) еще раз добавляли EDC и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Реакционную смесь напрямую концентрировали и подвергали азеотропной перегонке в присутствии метанола и PhMe для выделения. Остаток очищали в системе CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве стационарной фазы и элюировали в градиенте от DCM (A) до 20% метанола в DCM (B) (0-15% B). Продукт элюировали при 0% B, при этом
- получали твердое вещество белого цвета. По данным метода ЖХ-МС: расщ. $[M+H]^+$ составила 325,04 m/z, найд. составила 325,35 m/z.

Пример 2

FSHD-подобная модель трансгенной мыши (FLExDUX4/HSA-MCM).

- 25 Для характеристики агентов РНКи DUX4 *in vivo* использовали трансгенную модель FSHD. Мышей FLExDUX4 (B6(Cg)-Gt(ROSA)26Sortm1.1(DUX4*)Plj/J) приобретали и скрещивали их с мышами HSA-MCM (Tg(ACTA1-cre/Esr1*)2Kesr/J) от фирмы Jackson Laboratories (JAX), при этом получали гомозиготное потомство, которое экспрессирует человеческий DUX4 в
- 30 скелетных мышцах при введении тамоксифена.

Мыши FLExDUX4. Подготовка

Мыши FLExDUX4 были созданы с использованием системы cre-зависимого одностороннего генетического переключения (FLEx). Гомозиготные мыши, несущие этот условный аллель DUX4, являлись жизнеспособными и фертильными. Два набора несовместимых обращенных наружу сайтов рекомбинации (loxP и lox511) фланкировали инвертированную последовательность DUX4 человека, включая экзоны 1-3 и оба интрона. Ген *DUX4* кодирует несколько альтернативных вариантов сплайсинга мРНК. Наследственное мышечное заболевание, плечелопаточно-лицевая мышечная дистрофия (FSHD), вызывается экспрессией гена DUX4, кодируемой полноразмерной изоформой мРНК *DUX4* (*DUX4-fl*). Как отмечалось ранее в данном контексте, мРНК DUX4-fl, которая кодирует фактор транскрипции парного гомеобоксного домена, обычно не экспрессируется в здоровых мышцах. Однако при FSHD редкая экспрессия DUX4-fl (менее чем в 1% мышечных волокон) инициирует каскад патогенных событий, включая апоптоз, дефекты дифференцировки, мышечную атрофию и восприимчивость к окислительному стрессу. В целом FSHD характеризуется медленно прогрессирующей мышечной дистрофией, которая преимущественно поражает скелетные мышцы лица, лопаток и плеч, но может поражать мышцы живота, тазобедренного пояса и голеней, при этом около 20% пациентов в конечном итоге теряют способность передвигаться.

Промотор DUX4 управляет экспрессией короткой непатогенной изоформы (*DUX4-s*) и более длинной цитотоксической изоформы (*DUX4-fl*). Эта цепь содержит 4 точечные мутации в 5'-донорных сайтах сплайсинга для двух мРНК *DUX4-s*, отменяющие экспрессию коротких изоформ и генерирующие только патогенную изоформу мРНК *DUX4-fl*.

Поскольку эта конструкция предназначалась для вставки в локус Gt(ROSA)26Sor, экспрессия *DUX4-fl* определяется тем, какая ткань(и) экспрессирует рекомбиназу Cre. При скрещивании с мышами, которые экспрессируют рекомбиназу Cre, в полученном потомстве будут рекомбинированы сайты loxP или lox511, что приведет к инверсии последовательности *DUX4-fl* человека и к ориентации смысловой цепи.

Гемизиготные и гомозиготные мыши характеризуются низким уровнем экспрессии DUX4-fl в отсутствие рекомбиназы Cre. У этих мышей наблюдается

алопеция, а с возрастом — мягкий стул, воспаление и мышечная слабость. Этому более подвержены гомозиготные особи, как и самцы по сравнению с самками.

Мыши HSA-MCM. Подготовка

Мыши HSA-MCM экспрессируют двойной химерный белок MerCreMer под контролем промотора ACTA1 (актин, альфа-1, скелетные мышцы) человека. Гетерозиготные мыши являются жизнеспособными и фертильными. Гомозиготы также жизнеспособны, но имеют значительно сниженную фертильность. Следует отметить, что двойной химерный белок MerCreMer обладает существенно большей Cre-рекомбиназной активностью с меньшей неспецифичностью по сравнению с одинарным химерным белком CreMer. Когда мышей HSA-MCM скрещивают с мышами, включающими loxP-фланкированные последовательности, Cre-опосредованная рекомбинация, индуцируемая тамоксифеном, приводит к делеции loxP-фланкированных последовательностей в скелетных мышцах конечностей, лица/языка и диафрагмы у потомства.

Двойной химерный белок MerCreMer состоит из Cre-рекомбиназы, фланкированной на каждом конце лиганд-связывающим доменом мутантного мышинового рецептора эстрогена (mer) (аминокислоты 281-599, G525R), который не связывает свой природный лиганд (17 β -эстрадиол) при физиологических концентрациях, но будет связывать синтетический лиганд рецепторов эстрогена - 4-гидрокситамоксифен (ОНТ или тамоксифен) и, с меньшей чувствительностью, ICI 182780. Будучи ограниченным цитоплазмой, MerCreMer может получить доступ только в ядерный компартмент после воздействия тамоксифена.

Индукция экспрессии DUX4 тамоксифеном

Тамоксифен, растворенный в кукурузном масле (1 мг/мл), вводили через желудочный зонд 2 или 3 раза в неделю для индукции повышенной экспрессии *DUX4* в скелетных мышцах в ходе всего исследования (обычно от 18 до 31 дня).

Оценка массы тела

Поскольку известно, что повышенная экспрессия *DUX4* приводит к атрофии мышц и потере массы тела в данной модели FSHD у животных, в раскрытых в данном контексте примерах массу тела регистрировали в ходе различных исследований, в том числе в дни приема тамоксифена или введения агента РНКи, и в день сбора ткани. Массу тела нормализовали к первому дню введения тамоксифена и средней массе тела «исходной» контрольной группы, в которой

вводили кукурузное масло (не содержащее тамоксифен) и физиологический раствор (не содержащий агента РНКи).

Оценка общей моторной координации

5 В течение недели перед введением тамоксифена или агентов РНКи мышей к приобретенному на фирме аппарату Rotarod не менее 5 раз. После введения тамоксифена и/или агентов РНКи общую моторную координацию оценивали с использованием аппарата Rotarod не менее двух раз в неделю, предпринимая при проведении оценки в среднем пять попыток ежедневно.

Отбор тканей

10 Мышей анестезировали 3-4% изофлураном и подвергали эвтаназии с использованием обескровливания. Исследуемые ткани, предназначенные для анализа экспрессии генов, собирали и быстро замораживали в жидком азоте, а затем хранили при -80°C. Исследуемые ткани, предназначенные для гистологии, фиксировали в формалине, затем заливали в парафин и окрашивали с
15 использованием гистохимических или иммуногистохимических протоколов.

Анализ экспрессии генов

Цельные замороженные ткани гомогенизировали с использованием системы гомогенизации тканей Precellys (Bertin) и выделяли РНК с помощью метода кислотной экстракции смесью тиоцианат гуанидина-фенол-хлороформ.
20 Экстрагированную РНК использовали для синтеза комплементарной ДНК с использованием набора SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (фирмы Thermo), а экспрессию DUX4 измеряли с помощью системы капельной цифровой ПЦР QX200 (Bio-Rad). Экспрессию Wfdc3 и Myo1g измеряли с использованием системы QuantFlex7 qRT-PCR (фирмы Applied Biosystems) и с использованием наборов праймеров/зондов Taqman (фирмы Thermo-Fisher), предназначенных для
25 обнаружения исследуемых генов. Экспрессию гена нормализовали к эталонному гену (например, Arl1) и среднему значению «базового уровня» контрольной группы, которой вводили кукурузное масло (не содержащее тамоксифен) и физиологический раствор (не содержащий агента РНКи).

30 Экспрессия четырех-дисульфидного корового домена 3 WAP-типа (Wfdc3) в качестве биомаркера активности DUX4 в мышцах мыши

Четырех-дисульфидный коровый домен 3 WAP-типа является хорошо задокументированной прямой мышшиной мишенью сверхэкспрессированного белка DUX4-fl. Экспрессию гена *Wfdc3* измеряли (с использованием qRT-PCR,

как описано выше) и использовали в качестве биомаркера активности DUX4 во взятой мышечной ткани.

Экспрессия миозина 1G (Myo1g) в качестве биомаркера активности DUX4 в мышцах мыши

Myo1g является хорошо задокументированной прямой мышинной мишенью сверхэкспрессированного белка DUX4-fl. Экспрессия гена Myo1g измеряется (с использованием qRT-PCR, как описано выше) и используется в качестве биомаркера активности DUX4 в собранной мышечной ткани.

Модель трансгенных мышей, подобную FSHD, как описано в примере 2, использовали для оценки агентов РНКи DUX4. Агенты РНКи DUX4, которые включали смысловую цепь и антисмысловую цепь, синтезировали с использованием фосфорамидитной твердофазной технологии в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области техники, и обычно используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как указано в примере 1 в данном контексте.

Пример 3

Введение *in vivo* агентов РНКи DUX4 трансгенным мышам с FSHD-подобным синдромом

В день 1 исследования мышам вводили инъекции между кожей и мышцами (т. е. подкожные инъекции) в область дряблой кожи в области шеи и плеч либо изотонического солевого раствора (контроль носителя), либо агента РНКи DUX4, приготовленного в изотоническом солевом растворе. Начиная с дня 4, три раза в неделю (дни 4, 6, 8, 10, 12) через зонд, мышам вводили по 100 мкл/20 г либо кукурузного масла (отрицательный контроль), либо тамоксифена, растворенного в кукурузном масле (1 мг/мл), вводили три раза в неделю (дни 4, 6, 8, 10, 12, 15, 17 и 19), чтобы вызвать повышенную экспрессию DUX4. Схема дозирования и подробное описание метода приведены в следующей таблице.

Таблица 7

Группы дозировки для примера 3

Группа	Агент РНКи и доза	Схема дозировки агента РНКи	Агент для введения	Схема дозировки агента для введения
1	Исходный уровень (без агента РНКи, инъекция физиологического раствора)	Н/о	Кукурузное масло (отрицательный контроль)	3 раза в неделю, начиная с дня 4
2	Положительный контроль (без агента РНКи, инъекция физиологического раствора)	Н/о	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
3	SM45b-L4-AD07218-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
4	SM45b-L4-AD07219-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
5	SM45b-L4-AD07275-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
6	SM45b-L4-AD07220-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
7	SM45b-L4-AD07276-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
8	SM45b-L4-AD07221-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
9	SM45b-L4-AD07277-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4

Группа	Агент РНКи и доза	Схема дозировки агента РНКи	Агент для введения	Схема дозировки агента для введения
10	SM45b-L4-AD07396-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4

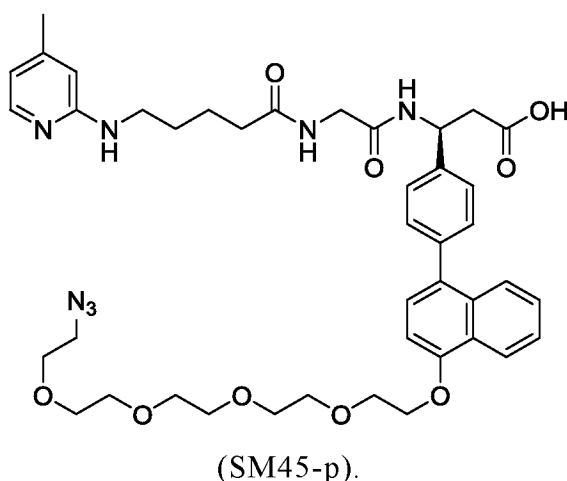
Агенты РНКи, описанные в примере 2 (группы 3-10) синтезировали с включенными нуклеотидными последовательностями, направленными на ген *DUX4* (т. е. транскрипт мРНК), и они включали функционализированную

5 реакционноспособную аминогруппу (NH₂-C6) на 5'-конце смысловой цепи для ускорения конъюгации с линкером L4, который можно конъюгировать с направляющим лигандом, небольшой молекулой, обладающей сродством к рецептору, присутствующему на клетках скелетных мышц (упоминаемому в данном контексте как «малая молекула рецептора клеток скелетных мышц»).

10 Процедуры конъюгации линкера со смысловой цепью и конъюгации направляющего лиганда с линкером представлены выше в примере 1.

Агенты РНКи DUX4 присоединены к малой молекулой направляющего лиганда SM45b, обладающего сродством к клеткам скелетных мышц. Агенты РНКи DUX4 присоединены к соединению, характеризующемуся следующей

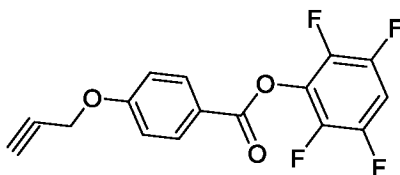
15 химической структурой:



Направляющий лиганд SM45-р синтезировали в виде азида, что обеспечило его эффективное присоединение к линкеру L4. Линкер L4 был первоначально синтезирован как соединение, функционализированное сложным

20

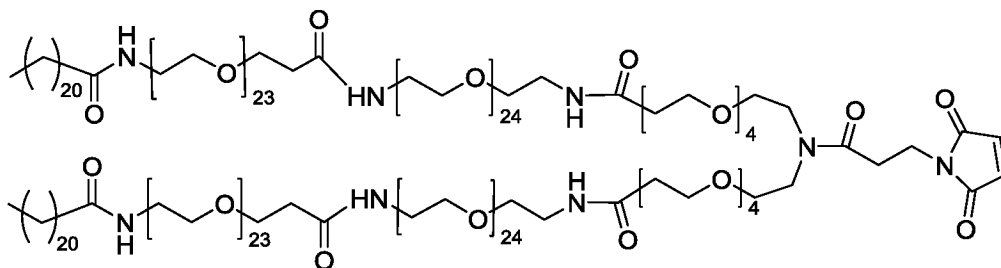
тетрафторфенильным эфиром (TFP), который характеризуется следующей структурой:



(L4).

5 Реакционноспособную сложноэфирную группу TFP сначала присоединяли к концевому амину (NH₂-C₆) на 5'-конце смысловой цепи. Затем азид SM45 присоединяли к алкину линкера (L4).

Агенты РНКи DUX4, описанные в примере 2, также синтезировали при включении дисульфидной функциональной группы (C₆-SS-C₆) на 3'-конце смысловой цепи для ускорения конъюгации с модулятором ФК/ФД. Фрагмент Бис(ПЭГ47+C22) присоединяли к 3'-концу смысловой цепи для получения фармакокинетического/фармакодинамического (ФК/ФД) модулятора, характеризующегося следующей структурой:



Бис(ПЭГ47+C22).

Малеимид присоединяли к 3'-концу смысловой цепи при восстановлении концевой 3'-дисульфидной связи и проведении реакции присоединения Михаэля к концевому 3'-тиолу. Как описано в данном контексте, модулятор ФК/ФД может увеличивать время циркуляции конъюгированного лекарственного средства и/или повышать активность агента РНКи в результате улучшенного связывания с клеточным рецептором, улучшенного захвата клетками и/или другими способами. После конъюгации с направляющим лигандом и модулятором ФК/ФД смысловые цепи агента РНКи DUX4 характеризовались общей структурой, указанной в таблице 4.5.

25 Нуклеотидные последовательности модифицированного агента РНКи синтезировали, как указано в данном контексте в таблице 3, таблице 4.1, таблице

4.6, а также в таблице 5.1, таблице 5.2, таблице 5.3 и в таблице 5.4 (показаны полностью модифицированные конъюгаты).

В каждой группе дозу вводили пяти мышам ($n=5$), за исключением группы 1, где дозу вводили только трем мышам ($n=3$). В день 21 животных умерщвляли и мышцы отбирали, обрабатывали и анализировали в соответствии с процедурами, описанными в примере 2.

Средняя относительная экспрессия DUX4 в отобранной ткани показана в следующих таблицах для различных типов мышц.

Таблица 8.1

10 Средняя относительная экспрессия DUX4 в бицепсах мышей, описанных в примере 3, нормализованная к контрольной группе (группа 1).

	Бицепс, день 21	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.259
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.323	0.327
Группа 3 (AD07218)	0.628	0.141
Группа 4 (AD07219)	0.941	0.340
Группа 5 (AD07275)	0.578	0.140
Группа 6 (AD07220)	0.922	0.589
Группа 7 (AD07276)	0.544	0.143
Группа 8 (AD07221)	0.878	0.170
Группа 9 (AD07277)	0.551	0.154
Группа 10 (AD07396)	1.096	0.406

Таблица 8.2

15 Средняя относительная экспрессия *DUX4* в диафрагме мышей, описанных в примере 3, нормализованная к контрольной группе (группа 1).

	Диафрагма, день 21	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.385
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.739	0.686
Группа 3 (AD07218)	1.227	0.422
Группа 4 (AD07219)	1.497	0.694
Группа 5 (AD07275)	0.806	0.340
Группа 6 (AD07220)	1.063	0.241
Группа 7 (AD07276)	0.636	0.196

	Диафрагма, день 21	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 8 (AD07221)	0.909	0.404
Группа 9 (AD07277)	0.891	0.059
Группа 10 (AD07396)	1.047	0.545

Таблица 8.3

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в EDL (длинный разгибатель пальцев) для мышей, описанных в примере 3, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

5

	EDL, день 21	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.231
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.076	0.172
Группа 3 (AD07218)	0.748	0.140
Группа 4 (AD07219)	0.759	0.268
Группа 5 (AD07275)	0.530	0.165
Группа 6 (AD07220)	0.664	0.064
Группа 7 (AD07276)	0.569	0.164
Группа 8 (AD07221)	0.662	0.249
Группа 9 (AD07277)	0.463	0.154
Группа 10 (AD07396)	0.874	0.166

Таблица 8.4

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в икроножной мышце для мышей, описанных в примере 3, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Икроножная мышца, день 21	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.375
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.663	0.509
Группа 3 (AD07218)	1.021	0.465
Группа 4 (AD07219)	1.159	0.756
Группа 5 (AD07275)	0.585	0.214
Группа 6 (AD07220)	0.998	0.395
Группа 7 (AD07276)	0.553	0.140
Группа 8 (AD07221)	0.647	0.191
Группа 9 (AD07277)	0.556	0.119

	Икроножная мышца, день 21	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 10 (AD07396)	0.819	0.483

Таблица 8.5

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в жевательных мышцах мышей, описанных в примере 3, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Жевательная мышца, день 21	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.206
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.585	0.659
Группа 3 (AD07218)	1.191	0.375
Группа 4 (AD07219)	1.325	0.353
Группа 5 (AD07275)	0.774	0.357
Группа 6 (AD07220)	1.161	0.515
Группа 7 (AD07276)	0.826	0.153
Группа 8 (AD07221)	1.219	1.077
Группа 9 (AD07277)	1.007	0.217
Группа 10 (AD07396)	0.976	0.277

5

Таблица 8.6

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в камбаловидной мышце мышей, описанных в примере 3, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Камбаловидная мышца, день 21	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.101
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	0.884	0.130
Группа 3 (AD07218)	0.916	0.283
Группа 4 (AD07219)	0.884	0.209
Группа 5 (AD07275)	0.711	0.243
Группа 6 (AD07220)	1.034	0.101
Группа 7 (AD07276)	0.800	0.168
Группа 8 (AD07221)	0.646	0.095
Группа 9 (AD07277)	0.799	0.061
Группа 10 (AD07396)	0.822	0.260

Таблица 8.7

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в ТА (передняя большеберцовая мышца) мышей, описанных в примере 3, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	ТА, день 21	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.675
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.121	0.353
Группа 3 (AD07218)	0.741	0.122
Группа 4 (AD07219)	0.874	0.367
Группа 5 (AD07275)	0.550	0.304
Группа 6 (AD07220)	0.819	0.122
Группа 7 (AD07276)	0.375	0.196
Группа 8 (AD07221)	0.636	0.285
Группа 9 (AD07277)	0.498	0.083
Группа 10 (AD07396)	0.805	0.327

5

Таблица 8.8

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в трапециевидной мышце у мышей, описанных в примере 3, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трапециевидная мышца, день 21	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.624
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	2.372	0.969
Группа 3 (AD07218)	1.298	0.688
Группа 4 (AD07219)	1.424	0.399
Группа 5 (AD07275)	0.711	0.126
Группа 6 (AD07220)	1.252	0.282
Группа 7 (AD07276)	0.688	0.334
Группа 8 (AD07221)	1.189	0.331
Группа 9 (AD07277)	0.765	0.321
Группа 10 (AD07396)	1.410	0.373

10

Таблица 8.9

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в трицепсе мышей из примера 3, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трицепс, день 21	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.380
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	2.812	0.542
Группа 3 (AD07218)	1.189	0.445
Группа 4 (AD07219)	1.240	0.426
Группа 5 (AD07275)	0.691	0.133
Группа 6 (AD07220)	1.302	0.522
Группа 7 (AD07276)	0.503	0.101
Группа 8 (AD07221)	1.150	0.160
Группа 9 (AD07277)	0.785	0.271
Группа 10 (AD07396)	1.322	0.502

- 5 Как обсуждалось в данном контексте, уровни транскрипта *Wfdc3* служат биомаркером уровней активности белка DUX4. Средние относительные уровни транскриптов *Wfdc3* в отобранной ткани определяли аналогичным образом, как показано в следующих таблицах для различных типов мышц.

Таблица 9.1

- 10 Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в бицепсах мышей, описанных в примере 3, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Бицепс, день 21		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.813	4.339
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	13.361	1.868	2.172
Группа 3 (AD07218)	9.383	4.112	7.319
Группа 4 (AD07219)	7.677	2.713	4.195
Группа 5 (AD07275)	1.678	0.732	1.298
Группа 6 (AD07220)	8.267	1.842	2.370
Группа 7 (AD07276)	2.320	0.964	1.650
Группа 8 (AD07221)	11.011	2.190	2.733
Группа 9 (AD07277)	8.878	1.748	2.177
Группа 10 (AD07396)	11.367	1.687	1.980

Таблица 9.2

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в диафрагме мышей, описанных в примере 3, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Диафрагма, день 21		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.664	1.975
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	18.199	3.336	4.085
Группа 3 (AD07218)	9.174	2.429	3.304
Группа 4 (AD07219)	6.604	3.138	5.978
Группа 5 (AD07275)	0.495	0.237	0.457
Группа 6 (AD07220)	10.531	2.171	2.734
Группа 7 (AD07276)	1.563	0.215	0.249
Группа 8 (AD07221)	15.696	3.022	3.743
Группа 9 (AD07277)	12.060	3.654	5.243
Группа 10 (AD07396)	18.914	3.786	4.733

5

Таблица 9.3

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в EDL (длинный разгибатель пальцев) для мышей, описанных в примере 3, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	EDL, день 21		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.852	5.777
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	12.724	1.272	1.413
Группа 3 (AD07218)	6.344	1.658	2.244
Группа 4 (AD07219)	6.694	0.893	1.031
Группа 5 (AD07275)	1.080	0.358	0.535
Группа 6 (AD07220)	6.976	1.300	1.597
Группа 7 (AD07276)	2.512	0.508	0.638
Группа 8 (AD07221)	8.875	1.493	1.795
Группа 9 (AD07277)	5.914	1.141	1.414
Группа 10 (AD07396)	10.992	1.059	1.172

Таблица 9.4

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в икроножной мышце для мышей, описанных в примере 3, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Икроножная мышца, день 21		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.820	4.547
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	8.719	2.368	3.251
Группа 3 (AD07218)	4.624	0.429	0.473
Группа 4 (AD07219)	5.130	0.952	1.169
Группа 5 (AD07275)	0.897	0.290	0.430
Группа 6 (AD07220)	6.630	0.606	0.668
Группа 7 (AD07276)	2.119	0.424	0.530
Группа 8 (AD07221)	8.283	0.689	0.751
Группа 9 (AD07277)	5.471	0.892	1.065
Группа 10 (AD07396)	8.881	1.075	1.223

5

Таблица 9.5

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в жевательной мышце мышей, описанных в примере 3, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Жевательная мышца, день 21		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.865	6.401
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	14.978	3.110	3.926
Группа 3 (AD07218)	5.741	0.618	0.693
Группа 4 (AD07219)	5.675	1.998	3.083
Группа 5 (AD07275)	1.333	0.506	0.815
Группа 6 (AD07220)	6.550	2.586	4.274
Группа 7 (AD07276)	1.952	0.492	0.659
Группа 8 (AD07221)	11.286	3.380	4.824
Группа 9 (AD07277)	5.732	1.860	2.754
Группа 10 (AD07396)	10.845	2.718	3.627

Таблица 9.6

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в камбаловидной мышце у мышей, описанных в примере 3, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Камбаловидная мышца, день 21		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.692	2.243
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	13.759	3.999	5.637
Группа 3 (AD07218)	11.716	1.296	1.457
Группа 4 (AD07219)	14.551	2.494	3.009
Группа 5 (AD07275)	7.020	1.053	1.239
Группа 6 (AD07220)	13.022	2.046	2.427
Группа 7 (AD07276)	8.457	1.391	1.665
Группа 8 (AD07221)	12.482	2.060	2.467
Группа 9 (AD07277)	11.943	1.119	1.235
Группа 10 (AD07396)	14.068	1.580	1.780

5

Таблица 9.7

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в ТА (передняя большеберцовая мышца) для мышей, описанных в примере 3, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	ТА, день 21		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.910	10.072
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	15.728	1.743	1.961
Группа 3 (AD07218)	6.427	0.572	0.628
Группа 4 (AD07219)	6.384	1.762	2.433
Группа 5 (AD07275)	0.983	0.425	0.749
Группа 6 (AD07220)	8.774	1.905	2.433
Группа 7 (AD07276)	2.507	0.466	0.572
Группа 8 (AD07221)	11.377	1.958	2.366
Группа 9 (AD07277)	7.636	1.613	2.045
Группа 10 (AD07396)	11.927	0.841	0.905

10

Таблица 9.8

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в трапецевидной мышце у мышей, описанных в примере 3, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трапецевидная мышца, день 21		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.846	5.489
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	13.554	2.388	2.899
Группа 3 (AD07218)	4.817	1.669	2.554
Группа 4 (AD07219)	3.640	1.035	1.446
Группа 5 (AD07275)	0.349	0.180	0.373
Группа 6 (AD07220)	5.388	0.974	1.189
Группа 7 (AD07276)	0.819	0.292	0.453
Группа 8 (AD07221)	9.104	1.209	1.394
Группа 9 (AD07277)	5.020	1.571	2.288
Группа 10 (AD07396)	10.919	1.398	1.603

5

Таблица 9.9

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в трицепсе мышей, описанных в примере 3, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трицепс, день 21		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.846	5.475
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	15.243	1.053	1.131
Группа 3 (AD07218)	3.624	1.143	1.671
Группа 4 (AD07219)	3.323	1.488	2.694
Группа 5 (AD07275)	0.334	0.114	0.173
Группа 6 (AD07220)	5.235	0.634	0.721
Группа 7 (AD07276)	0.965	0.123	0.141
Группа 8 (AD07221)	10.811	2.080	2.575
Группа 9 (AD07277)	5.284	1.677	2.456
Группа 10 (AD07396)	11.046	2.195	2.740

10 Кроме того, измерения массы тела проводили в дни 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20 и 21. Сохранение массы тела может свидетельствовать о профилактическом эффекте. Масса тела, нормализованная в день 4 (до введения тамоксифена), и исходный уровень указаны на фиг. 1.

Для агентов РНКи DUX4, показанных выше, AD07218 (группа 3) включал нуклеотидные последовательности, предназначенные для ингибирования гена *DUX4* (т.е. транскрипта мРНК DUX4) в положении 408 гена; AD07219 и AD07275 (группы 4 и 5) включали нуклеотидные последовательности, предназначенные для ингибирования гена *DUX4* в положении 409 гена; AD07220 и AD07276 (группы 6 и 7) включали нуклеотидные последовательности, предназначенные для ингибирования гена *DUX4* в положении 1437 гена; AD07221 и AD07277 (группы 8 и 9) включали нуклеотидные последовательности, предназначенные для ингибирования гена *DUX4* в положении 1518 гена; и AD07396 (группа 10) включали нуклеотидные последовательности, предназначенные для ингибирования гена *DUX4* в положении 1496 гена.

Как показывают данные в приведенных выше таблицах, агенты РНКи DUX4 обеспечивают снижение экспрессии гена *DUX4* в мышечной FSHD-подобной модели, при этом агенты РНКи DUX4, направленные на положения 408, 409 и 1437, прежде всего свидетельствуют о существенном ингибировании экспрессии гена *DUX4*. Например, как показано в таблицах 8.1–8.9, относительная экспрессия DUX4 в группах 3, 5 и 7, в которых вводили агент РНКи DUX4, оставалась значительно ниже группы тамоксифена и на уровне или ниже уровня исходной группы во всех мышцах, что указывает на профилактический эффект. Этот эффект был подтвержден предотвращением резкого увеличения экспрессии *Wfdc3* в группах 5 и 7, как показано в таблицах 9.1–9.9, и предотвращением потери массы тела в группах 5 и 7 (фиг. 1).

Пример 4

Введение *in vivo* агентов РНКи, направленных на *DUX4*, у трансгенных мышей с FSHD-подобным синдромом.

Модель трансгенных мышей с FSHD-подобным синдромом, как описано в примере 2, использовали для оценки агентов РНКи DUX4. Агенты РНКи DUX4, которые включали смысловую цепь и антисмысловую цепь, синтезировали в соответствии с твердофазной фосфоамидитной технологией в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области техники и обычно используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как указано в примере 1 в данном контексте.

В день 1 исследования мышам вводили инъекции между кожей и мышцами (т. е. подкожные инъекции) в область дряблой кожи в области шеи и плеч либо изотонического солевого раствора (контроль носителя), либо изотонического солевого раствора (контроль носителя), либо агента РНКи DUX4,

- 5 при приготовленного в изотоническом солевом растворе. Начиная с дня 4, три раза в неделю (т.е. в дни 12, 15, 17 и 19), чтобы вызвать повышенную экспрессию *DUX4*. Схема дозировки и подробное описание метода приведены в следующей таблице:

Таблица 10

10 Группы дозировки для мышей, описанных в примере 4.

Группа	Агент РНКи и доза	Схема дозировки агента РНКи	Агент для введения	Схема дозировки агента для введения
1	Исходный уровень (без агента РНКи, инъекция физиологического раствора)	н/о	Кукурузное масло (отрицательный контроль)	3 раза в неделю, начиная с дня 4
2	Положительный контроль (без агента РНКи, инъекция физиологического раствора)	н/о	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
3	SM45b-L4-AD07276-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1-7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
4	SM45b-L4-AD07510-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1-7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
5	SM45b-L4-AD07511-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1-7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
6	SM45b-L4-AD07512-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1-7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
7	SM45b-L4-AD07513-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1-7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
8	SM45b-L4-AD07514-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1-7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
9	SM45b-L4-AD07515-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в 1 дни 1-7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
10	SM45b-L4-AD07394-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1-7	Тамоксифен	3 раза в неделю,

Группа	Агент РНКи и доза	Схема дозирования агента РНКи	Агент для введения	Схема дозирования агента для введения
				начиная с дня 4
11	SM45b-L4-AD07395-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1-7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
12	SM45b-L4-AD07398-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1-7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
13	SM45b-L4-AD07399-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1-7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4

Агенты РНКи, описанные в примере 4 (группы 3-13), синтезировали при включении нуклеотидных последовательностей, направленных на ген *DUX4* (т.е. транскрипт мРНК *DUX4*), и включали функционализированную

5 реакционноспособную аминогруппу (NH₂-C₆) на 5'-конце смысловой нити для ускорения конъюгации с малой молекулой рецептора клеток скелетных мышц, направленной на лиганд SM45. Направляющий лиганд SM45 синтезировали в виде азида, что позволило повысить эффективность его связывания с линкером L4. (См., например, вышеприведенный пример 3 для информации о структурах и

10 сопутствующих сведениях относительно SM45 и L4).

Агенты РНКи *DUX4*, описанные в примере 2, также синтезировали при включении дисульфидной функциональной группы (C₆-SS-C₆) на 3'-конце смысловой цепи для ускорения конъюгации с ФК/ФД-модулятором Бис(ПЭГ47+C22). (См., например, вышеприведенный пример 3 для информации

15 о структуре и сопутствующей информации.)

Нуклеотидные последовательности модифицированного агента РНКи синтезировали, как описано в данном контексте в таблице 3, таблице 4.1, таблице 4.6 и в таблице 5.1, таблице 5.2, таблице 5.3 и таблице 5.4 (показаны полностью модифицированные конъюгаты).

20 В каждой группе дозу вводили пяти мышам (n=5), за исключением группы 1, где дозу вводили только 4 мышам (n=4). В день 22 животных умерщвляли, мышцы извлекали, обрабатывали и анализировали в соответствии с процедурами, описанными в примере 2.

Измерения массы тела проводили в дни 1, 4, 7, 8, 10, 12, 14, 18, 21 и 22, и, как отмечалось выше, сохранение массы тела могло свидетельствовать о профилактическом эффекте в отношении истощения мышц. Агенты РНКи группы 10 (AD07394), группы 11 (AD07395), группы 12 (AD07398) и группы 13 (AD07399) не оказывали действия на приемлемое сохранение массы тела по сравнению с положительным контролем (введение только тамоксифена) и поэтому дополнительную оценку по этим группам не проводили. Кроме того, в то время как в группе 8 (AD07514) и в группе 13 (AD07399) наблюдался некоторый профилактический эффект в отношении поддержания массы тела, масса тела снизилась в большей степени, чем в случае применения некоторых других агентов РНКи, направленных на то же положение гена DUX4, и, таким образом, дальнейшую оценку для этих групп также не проводили. Масса тела, нормализованная в день 4 (до введения тамоксифена) и на исходный уровень, показана на фигурах 2 и 3.

Средняя относительная экспрессия DUX4 в извлеченной ткани показана в следующих таблицах для различных типов мышц для групп 1-7 и 9.

Таблица 11.1. Средняя относительная экспрессия DUX4 в бицепсах мышечных тканей, описанных в примере 4, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

Таблица 11.1

Средняя относительная экспрессия DUX4 в бицепсах мышечных тканей, описанных в примере 4, нормализованная к исходному уровню производительности (группа 1).

	Бицепс, день 22	
	Относительная экспрессия DUX4	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.498
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.678	0.299
Группа 3 (AD07276)	1.016	0.167
Группа 4 (AD07510)	0.861	0.345
Группа 5 (AD07511)	0.819	0.161
Группа 6 (AD07512)	1.045	0.509
Группа 7 (AD07513)	0.716	0.157
Группа 9 (AD07515)	0.834	0.430

Таблица 11.2

Средняя относительная экспрессия DUX4 в диафрагме мышей, описанных в примере 4, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Диафрагма, день 22	
	Относительная экспрессия DUX4	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.226
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	2.273	0.830
Группа 3 (AD07276)	1.535	0.519
Группа 4 (AD07510)	1.096	0.361
Группа 5 (AD07511)	0.755	0.158
Группа 6 (AD07512)	2.129	0.429
Группа 7 (AD07513)	1.230	0.440
Группа 9 (AD07515)	0.757	0.252

5 Таблица 11.3

Средняя относительная экспрессия DUX4 в икроножных мышцах мышей, описанных в примере 4, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Икроножная мышца, день 22	
	Относительная экспрессия DUX4	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.272
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.156	0.212
Группа 3 (AD07276)	1.264	0.107
Группа 4 (AD07510)	0.872	0.376
Группа 5 (AD07511)	0.534	0.101
Группа 6 (AD07512)	0.987	0.248
Группа 7 (AD07513)	1.318	0.994
Группа 9 (AD07515)	1.756	0.744

Таблица 11.4

10 Средняя относительная экспрессия DUX4 в жевательных мышцах мышей, описанных в примере 4, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Жевательная мышца, день 22	
	Относительная экспрессия DUX4	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.267
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	0.867	0.165

	Жевательная мышца, день 22	
	Относительная экспрессия DUX4	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 3 (AD07276)	0.500	0.153
Группа 4 (AD07510)	0.603	0.215
Группа 5 (AD07511)	0.449	0.142
Группа 6 (AD07512)	0.915	0.236
Группа 7 (AD07513)	0.438	0.105
Группа 9 (AD07515)	0.447	0.094

Таблица 11.5

Средняя относительная экспрессия DUX4 в ТА (передняя большеберцовая мышца) мышей, описанных в примере 4, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

5

	ТА, день 22	
	Относительная экспрессия DUX4	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.177
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.429	0.484
Группа 3 (AD07276)	0.767	0.117
Группа 4 (AD07510)	0.643	0.105
Группа 5 (AD07511)	0.516	0.161
Группа 6 (AD07512)	0.775	0.189
Группа 7 (AD07513)	0.634	0.207
Группа 9 (AD07515)	0.618	0.171

Таблица 11.6

Средняя относительная экспрессия DUX4 в трапецевидной мышце мышей, описанных в примере 4, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трапецевидная мышца, день 22	
	Относительная экспрессия DUX4	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.306
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.669	0.280
Группа 3 (AD07276)	0.707	0.210
Группа 4 (AD07510)	0.710	0.233
Группа 5 (AD07511)	0.543	0.161
Группа 6 (AD07512)	0.833	0.290
Группа 7 (AD07513)	0.541	0.193
Группа 9 (AD07515)	0.549	0.248

Таблица 11.7

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в трицепсе мышей, описанных в примере 4, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трицепс, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.410
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.679	0.885
Группа 3 (AD07276)	0.487	0.081
Группа 4 (AD07510)	0.480	0.096
Группа 5 (AD07511)	0.391	0.118
Группа 6 (AD07512)	0.550	0.179
Группа 7 (AD07513)	0.327	0.120
Группа 9 (AD07515)	0.287	0.074

5

Средние относительные уровни транскриптов мРНК *Wfdc3* в извлеченной ткани определяли аналогичным образом, как показано в следующих таблицах для различных типов мышц для групп 1-7 и 9.

Таблица 12.1

10 Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в бицепсах мышей, описанных в примере 4, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Бицепс, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.900	9.018
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	16.231	4.505	6.236
Группа 3 (AD07276)	4.928	1.787	2.802
Группа 4 (AD07510)	9.048	3.580	5.925
Группа 5 (AD07511)	1.478	0.415	0.577
Группа 6 (AD07512)	13.042	2.577	3.212
Группа 7 (AD07513)	1.922	0.834	1.475
Группа 9 (AD07515)	2.589	1.172	2.141

Таблица 12.2

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в диафрагме мышей, описанных в примере 4, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Диафрагма, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.780	3.554
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	17.540	6.624	10.642
Группа 3 (AD07276)	1.834	0.986	2.132
Группа 4 (AD07510)	7.582	3.337	5.960
Группа 5 (AD07511)	0.531	0.164	0.236
Группа 6 (AD07512)	10.993	2.761	3.687
Группа 7 (AD07513)	0.621	0.297	0.570
Группа 9 (AD07515)	1.024	0.319	0.463

5 Таблица 12.3

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в икроножной мышце мышей, описанных в примере 4, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Икроножная мышца, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.799	3.981
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	5.449	1.871	2.849
Группа 3 (AD07276)	1.455	0.533	0.842
Группа 4 (AD07510)	3.452	0.735	0.934
Группа 5 (AD07511)	0.461	0.104	0.135
Группа 6 (AD07512)	3.895	0.420	0.470
Группа 7 (AD07513)	0.590	0.228	0.371
Группа 9 (AD07515)	0.712	0.284	0.472

Таблица 12.4

10 Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в жевательной мышце мышей, описанных в примере 4, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Жевательная мышца, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.794	3.862
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	7.246	2.966	5.021

	Жевательная мышца, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 3 (AD07276)	1.353	0.595	1.062
Группа 4 (AD07510)	3.051	0.834	1.148
Группа 5 (AD07511)	0.299	0.093	0.135
Группа 6 (AD07512)	3.994	1.011	1.354
Группа 7 (AD07513)	0.337	0.152	0.275
Группа 9 (AD07515)	0.569	0.154	0.212

Таблица 12.5

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в ТА (передняя большеберцовая мышца) мышей, описанных в примере 4, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

5

	ТА, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.925	12.306
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	18.324	8.692	16.536
Группа 3 (AD07276)	2.436	1.027	1.775
Группа 4 (AD07510)	5.873	1.830	2.658
Группа 5 (AD07511)	0.539	0.235	0.417
Группа 6 (AD07512)	7.128	1.095	1.293
Группа 7 (AD07513)	0.694	0.314	0.574
Группа 9 (AD07515)	1.148	0.481	0.827

Таблица 12.6

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в трапециевидных мышцах мышей, описанных в примере 4, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

10

	Трапециевидная мышца, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.840	5.248
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	8.145	3.444	5.969
Группа 3 (AD07276)	0.966	0.529	1.168
Группа 4 (AD07510)	3.212	1.085	1.638
Группа 5 (AD07511)	0.154	0.052	0.079
Группа 6 (AD07512)	4.472	1.194	1.629

	Трапецевидная мышца, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 7 (AD07513)	0.206	0.101	0.197
Группа 9 (AD07515)	0.379	0.157	0.267

Таблица 12.7

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в трицепсе мышей, описанных в примере 4, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трицепс, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.853	5.811
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	8.594	3.757	6.675
Группа 3 (AD07276)	1.115	0.472	0.820
Группа 4 (AD07510)	3.253	0.926	1.295
Группа 5 (AD07511)	0.326	0.108	0.161
Группа 6 (AD07512)	3.948	0.932	1.219
Группа 7 (AD07513)	0.451	0.168	0.268
Группа 9 (AD07515)	0.590	0.176	0.251

5

Для агентов РНКи DUX4, показанных выше, AD07276, AD07510, AD07511, AD07512, AD07513, AD07514, AD07515 (группы 3-9) включали нуклеотидные последовательности, сконструированные для ингибирования гена *DUX4* (т.е. транскрипта мРНК DUX4) в положении 1437 гена; AD07394 и AD07395 (группы 10 и 11) включали нуклеотидные последовательности, предназначенные для ингибирования гена *DUX4* в положении 1433 гена; AD07398 и AD07399 (группы 12 и 13) включали нуклеотидные последовательности, предназначенные для ингибирования гена *DUX4* в положении 1522 гена.

10

Как показывают данные в приведенных выше таблицах, агенты РНКи DUX4, направленные на положение 1437 гена, обеспечивают снижение экспрессии гена DUX4 в модели FSHD-подобных мышей. Особо следует отметить, что уровни экспрессии гена *DUX4* оказывались ниже исходного уровня, а уровни экспрессии гена *Wfdc3* оказывались значительно ниже исходного уровня в 7 из 7 мышц, проанализированных у мышей, которым вводили AD07511 (см. таблицы 11.1–11.7 и 12.1–12.7).

15

20

Пример 5

Введение in vivo агентов РНКи, направленных на *DUX4*, у трансгенных мышей с FSHD-подобным синдромом.

5 Модель трансгенных мышей с FSHD, как описано в примере 2, использовали для оценки агентов РНКи *DUX4*. Агенты РНКи *DUX4*, которые включали смысловую цепь и антисмысловую цепь, синтезировали в соответствии с фосфорамидитной технологией на твердой фазе в соответствии с общими процедурами, известными в данной области техники и обычно используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как указано в примере 1 в данном контексте.

10 В день исследования 1 мышам вводили инъекцию между кожей и мышцей (т. е. подкожными инъекциями) в область дряблой кожи в области шеи и плеч либо изотоническим солевым раствором (контроль носителя), либо агентом РНКи *DUX4*, приготовленным в изотоническом солевом растворе. Начиная с 4-го дня, три раза в неделю (дни 4, 6, 8, 10, 12, 15, 17 и 19) через зонд вводили 15 мышам 100 мкл/20 г либо кукурузного масла (отрицательный контроль), либо тамоксифена, растворенного в кукурузном масле (1 мг/мл), чтобы вызвать повышенную экспрессию *DUX4*. Схема дозировки и подробности приведены в следующей таблице.

20 Таблица 13

Группы дозировки мышей из примера 5.

Группа	Агент РНКи и доза	Схема дозировки агента РНКи	Агент для введения	Схема дозировки агента для введения
1	Исходный уровень (без агента РНКи, инъекция физиологического раствора)	н/о	Кукурузное масло (отрицательный контроль)	3 раза в неделю, начиная с дня 4
2	Положительный контроль (без агента РНКи, инъекция физиологического раствора)	н/о	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
3	SM45b-L4-AD07218-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1-7	Tamoxifen	3 раза в неделю, начиная с дня 4

Группа	Агент РНКи и доза	Схема дозировки агента РНКи	Агент для введения	Схема дозировки агента для введения
4	SM45b-L4-AD07274-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1-7	Tamoxifen	3 раза в неделю, начиная с дня 4
5	SM45b-L4-AD07775-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1-7	Tamoxifen	3 раза в неделю, начиная с дня 4
6	SM45b-L4-AD07776-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1-7	Tamoxifen	3 раза в неделю, начиная с дня 4
7	SM45b-L4-AD07777-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1-7	Tamoxifen	3 раза в неделю, начиная с дня 4
8	SM45b-L4-AD07778-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1-7	Tamoxifen	3 раза в неделю, начиная с дня 4

Агенты РНКи в примере 5 (группы 3-8) синтезировали с нуклеотидными последовательностями, направленными на ген *DUX4*, и включали функционализованную реакционноспособную аминогруппу (NH₂-C6) на 5'-конце смысловой цепи для ускорения конъюгирования с малой молекулой рецептора клеток скелетных мышц, направленной на лиганд SM45.

Направляющий лиганд SM45 синтезировали в виде азида, что позволило оптимально связать его с линкером L4 (см., например, приведенный выше пример 3 для получения информации о структуре и сопутствующей информации для SM45 и L4).

Агенты РНКи DUX4 из примера 2 дополнительно синтезировали с дисульфидной функциональной группой (C6-SS-C6) на 3'-конце смысловой цепи для ускорения конъюгирования с ФК/ФД-модулятором Бис(ПЭГ47+C22). (см., например, выше приведенный пример 3 для получения информации о структуре и сопутствующей информации).

Нуклеотидные последовательности модифицированного агента РНКи синтезировали, как указано в данном контексте в таблице 3, таблице 4.1, таблице

4.6 и в таблице 5.1, таблице 5.2, таблице 5.3 и таблице 5.4 (показаны полностью модифицированные конъюгаты).

В каждой группе дозу вводили пяти мышам ($n=5$). В день 22 животных забивали, мышцы собирали, обрабатывали и анализировали в соответствии с процедурами, описанными в примере 2.

Измерения массы тела проводили в дни 1, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18 и 21, и, как отмечалось выше, сохранение массы тела может свидетельствовать о профилактическом эффекте на истощение мышц. Агенты РНКи из группы 3 (AD07218), группы 5 (AD07775) и группы 7 (AD07777) продемонстрировали некоторый профилактический эффект в отношении поддержания массы тела. Однако агенты РНКи DUX4 AD07274, AD07776 и AD07778 продемонстрировали наилучшие результаты из испытанных агентов РНКи в отношении сохранения массы тела животного после введения тамоксифена и были подвергнуты дополнительной оценке. Масса тела, нормализованная на день 4 (до введения тамоксифена), и исходный уровень показаны на фиг. 4.

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в собранной ткани показана в следующих таблицах для различных типов мышц для групп 1, 2, 4, 6 и 8.

Таблица 14.1

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в бицепсах мышей из примера 5, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Бицепс, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.634
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	2.414	0.840
Группа 4 (AD07274)	0.725	0.353
Группа 6 (AD07776)	1.092	0.394
Группа 8 (AD07778)	1.534	0.738

Таблица 14.2

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в диафрагме мышей из примера 5, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Диафрагма, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.504
Группа 2 (Положительный	2.024	0.872

	Диафрагма, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
контроль (только Тамоксифен))		
Группа 4 (AD07274)	0.488	0.062
Группа 6 (AD07776)	0.745	0.198
Группа 8 (AD07778)	0.734	0.466

Таблица 14.3

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в икроножных мышцах мышей из примера 5, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Икроножная мышца, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.308
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	2.343	1.059
Группа 4 (AD07274)	0.643	0.397
Группа 6 (AD07776)	0.676	0.310
Группа 8 (AD07778)	0.634	0.353

5

Таблица 14.4

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в жевательных мышцах мышей из примера 5, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Жевательная мышца, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.388
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.974	0.761
Группа 4 (AD07274)	0.685	0.236
Группа 6 (AD07776)	0.639	0.190
Группа 8 (AD07778)	0.798	0.127

10

Таблица 14.5

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в ТА (передняя большеберцовая мышца) мышей из примера 5, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	ТА, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.180
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.471	0.503

	ТА, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 4 (AD07274)	0.623	0.176
Группа 6 (AD07776)	0.616	0.123
Группа 8 (AD07778)	0.768	0.258

Таблица 14.6

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в трапециевидных мышцах мышей из примера 5, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трапециевидная мышца, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.216
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	4.907	2.097
Группа 4 (AD07274)	0.930	0.487
Группа 6 (AD07776)	1.180	0.273
Группа 8 (AD07778)	1.106	0.965

5

Таблица 14.7

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в трицепсах мышей из примера 5, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трицепс, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.421
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	2.284	0.888
Группа 4 (AD07274)	1.004	0.697
Группа 6 (AD07776)	0.666	0.346
Группа 8 (AD07778)	0.768	0.529

10 Средние относительные уровни транскриптов мРНК *Wfdc3* в собранной ткани определяли аналогичным образом, как показано в следующих таблицах для различных типов мышц для групп 1, 2, 4, 6 и 8:

Таблица 15.1

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в бицепсах мышей из примера 5, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Бицепс, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.848	5.574
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	37.917	4.969	5.718
Группа 4 (AD07274)	3.269	1.221	1.948
Группа 6 (AD07776)	1.017	0.316	0.459
Группа 8 (AD07778)	0.940	0.580	1.518

5 Таблица 15.2. Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в диафрагме у мышей из примера 5, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Диафрагма, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.814	4.371
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	69.613	13.167	16.238
Группа 4 (AD07274)	0.766	0.260	0.393
Группа 6 (AD07776)	0.307	0.139	0.256
Группа 8 (AD07778)	0.323	0.166	0.342

Таблица 15.3. Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в икроножных мышцах мышей из примера 5, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Икроножная мышца, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.807	4.179
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	17.428	2.830	3.378
Группа 4 (AD07274)	1.136	0.303	0.414
Группа 6 (AD07776)	0.339	0.091	0.124

	Икроножная мышца, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 8 (AD07778)	0.458	0.166	0.260

Таблица 15.4. Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в жевательных мышцах мышей из примера 5, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Жевательная мышца, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.825	4.715
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	16.944	2.072	2.361
Группа 4 (AD07274)	0.646	0.191	0.272
Группа 6 (AD07776)	0.061	0.009	0.011
Группа 8 (AD07778)	0.089	0.052	0.126

5 Таблица 15.5. Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в ТА (передняя большеберцовая мышца) для мышей из примера 5, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	ТА, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.867	6.517
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	41.110	5.691	6.605
Группа 4 (AD07274)	1.034	0.265	0.356
Группа 6 (AD07776)	0.198	0.122	0.314
Группа 8 (AD07778)	0.294	0.204	0.670

Таблица 15.6. Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в трапецевидных мышцах из примера 5, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трапецевидная мышца, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.851	5.697
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	31.526	3.384	3.791
Группа 4 (AD07274)	0.424	0.255	0.640
Группа 6 (AD07776)	0.073	0.027	0.043
Группа 8 (AD07778)	0.099	0.053	0.113

5 Таблица 15.7. Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в трицепсе мышей из примера 5, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трицепс, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.774	3.428
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	23.499	3.361	3.922
Группа 4 (AD07274)	0.385	0.124	0.182
Группа 6 (AD07776)	0.060	0.032	0.067
Группа 8 (AD07778)	0.100	0.053	0.113

10 Для всех агентов РНКи DUX4, показанных выше, агенты РНКи включали нуклеотидные последовательности, предназначенные для ингибирования гена *DUX4* в положении 408 гена. Как показано в данном контексте, агенты РНКи DUX4 продемонстрировали существенное снижение соответствующих параметров, при этом AD07776 и AD07778 характеризовались особой эффективностью в снижении экспрессии генов DUX4 и *Wfdc3*.

Пример 6

15 Введение in vivo агентов РНКи, направленных на *DUX4*, трансгенным мышам с FSHD-подобным синдромом.

Использовали FSHD-подобную модель трансгенных мышей, как описано в примере 2, для оценки агентов РНКи DUX4. Агенты РНКи DUX4, которые

включали смысловую цепь и антисмысловую цепь, синтезировали в соответствии с фосфорамидитной технологией на твердой фазе в соответствии с общими процедурами, известными в данной области техники и обычно используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как указано в примере 1 в данном контексте.

В первый день исследования мышам вводили инъекции между кожей и мышцами (т. е. подкожные инъекции) в область дряблой кожи в области шеи и плеч либо изотонического раствора (контроль носителя), либо агента РНКи DUX4, приготовленного в изотоническом растворе. Начиная с дня 4, три раза в неделю (дни 4, 6, 8, 10, 12) через зонд вводили мыши 100 мкл/20 г либо кукурузного масла (отрицательный контроль), либо тамоксифена, растворенного в кукурузном масле (1 мг/мл), 15, 17 и 19), чтобы вызвать повышенную экспрессию *DUX4*. Схема дозировки и подробноеписание метода приведены в следующей таблице:

Таблица 16

Группы дозировки мышей из примера 6.

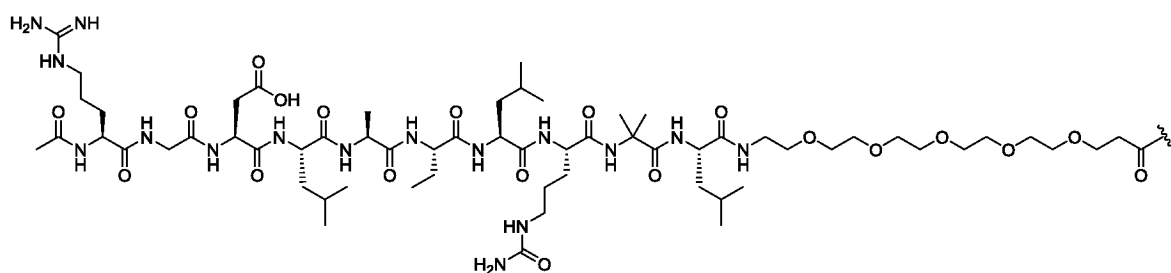
Группа	Агент РНКи и доза	Схема дозировки агента РНКи	Агент для введения	Схема дозировки агента для введения
1	Исходный уровень (без агента РНКи, инъекция физиологического раствора)	н/о	Кукурузное масло (отрицательный контроль)	3 раза в неделю, начиная с дня 4
2	Положительный контроль (без агента РНКи, инъекция физиологического раствора)	н/о	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
3	SM45b-L4-AD07511-Бис(ПЭГ47+C22)	1 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
4	SM45b-L4-AD07511-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
5	SM45b-L4-AD07843-Бис(ПЭГ47+C22)	1 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4

Группа	Агент РНКи и доза	Схема дозирования агента РНКи	Агент для введения	Схема дозирования агента для введения
6	SM45b-L4-AD07843-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
7	SM45b-L4-AD07844-Бис(ПЭГ47+C22)	1 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
8	SM45b-L4-AD07844-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
9	SM45b-L4-AD07776-Бис(ПЭГ47+C22)	1 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
10	SM45b-L4-AD07776-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
11	SM45b-L4-AD07778-Бис(ПЭГ47+C22)	1 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
12	SM45b-L4-AD07778-Бис(ПЭГ47+C22)	5 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
13	$\alpha\upsilon\beta 6$ Пептид 1-AD07511-LP38b	1 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
14	$\alpha\upsilon\beta 6$ Пептид 1-AD07511-LP38b	1 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4

Агенты РНКи в примере 6 (группы 3-14) синтезировали с нуклеотидными последовательностями, направленными на ген *DUX4*, и включали функционализованную реакционноспособную аминогруппу (NH₂-C₆) на 5'-конце смысловой цепи для ускорения конъюгирования с соответствующим направляющим лигандом.

Для групп 3-12 направляющий лиганд SM45 синтезировали в виде азида, что позволило оптимально связать его с линкером L4 (см., например, пример 3, приведенный выше, для получения информации о структуре и сопутствующей информации для SM45 и L4).

- 5 Для групп 13-14 пептид, характеризующийся сродством к рецептору, присутствующему на клетках скелетных мышц, конъюгировали со смысловой цепью агента РНКи DUX4. Пептид рецептора клеток скелетных мышц (пептид 1) связывали с агентом РНКи с использованием реакции конденсации амида, как описано выше в примере 1, на 5'-конце смысловой цепи. бvвб пептид 1
- 10 представлен следующей структурой:

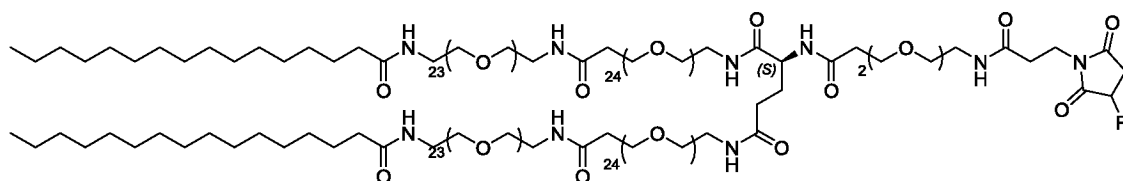


где элемент NH_2 указывает на место присоединения к агенту РНКи (через реакционноспособный аминовый (NH_2 -C6) линкер).

- 15 Агенты РНКи DUX4 в примере 6 дополнительно синтезировали с дисульфидной функциональной группой (C6-SS-C6) на 3'-конце смысловой цепи для ускорения конъюгирования с модулятором ФК/ФД.

- Для групп 3-12 фрагмент Бис(ПЭГ47+C22) присоединяли к 3'-концу смысловой цепи, чтобы использовать его в качестве фармакокинетического/фармакодинамического (ФК/ФД) модулятора (см., например, выше приведенный пример 3 для получения информации о структуре и сопутствующей информации).
- 20

- Для групп 13–14 фрагмент LP38b присоединяли к 3'-концу смысловой цепи, чтобы использовать его в качестве фармакокинетического/фармакодинамического (ФК/ФД) модулятора, имеющего следующую структуру:
- 25



где R представляет собой остаток агента РНКи. Малеймид связывали с 3'-концом смысловой цепи с помощью восстановления концевой 3'-дисульфидной связи и проведения присоединения по Михаэлю к концевому 3'-тиолу.

Нуклеотидные последовательности модифицированного агента РНКи синтезировали, как показано в данном контексте в таблице 3, таблице 4.1, таблице 4.6 и таблице 5.1, таблице 5.2, таблице 5.3 и таблице 5.4 (показаны полностью модифицированные конъюгаты).

В каждой группе дозу вводили шести мышам (n=6). На день 22 животных забивали, мышцы собирали, обрабатывали и анализировали в соответствии с процедурами, описанными в примере 2.

Измерения массы тела проводили в дни 1, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 15, 17, 19 и 22 и нормализовали к дню 4 (до введения тамоксифена) и исходному уровню, как показано на фиг. 5 (1 мг/кг) и фиг. 6 (5 мг/кг). Масса тела сохранялась выше уровней положительного контроля во всех группах, получавших 1 или 5 мг/кг агента РНКи. Особо следует отметить, что животные, получавшие AD07511, AD07776 и AD07778, поддерживали массу тела на уровне, эквивалентном исходному уровню, как при введении 1, так и 5 мг/кг.

Для определенных групп исследовали среднюю относительную экспрессию *DUX4* в собранной ткани, как показано в следующих таблицах для различных типов мышц.

Таблица 17.1

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в бицепсах мышей из примера 6, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Бицепс, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.502
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.574	0.380
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.801	0.243
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.674	0.253
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.991	0.184
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.422	0.188

	Бицепс, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\beta6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.880	0.250
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\beta6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.622	0.222

Таблица 17.2

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в диафрагме мышц из примера 6, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Диафрагма, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.270
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	2.025	0.716
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	1.045	0.317
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.857	0.652
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	1.090	0.478
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	1.067	0.455
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\beta6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	1.087	0.349
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\beta6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.709	0.257

5

Таблица 17.3

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в икроножных мышцах мышц из примера 6, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Икроножная мышца, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.202
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.778	1.042
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.967	0.464
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.505	0.313

	Икроножная мышца, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.799	0.204
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.796	0.481
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.531	0.261
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.547	0.248

Таблица 17.4

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в жевательных мышцах мышей из примера 6, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Жевательная мышца, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.326
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.376	0.398
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	1.124	0.456
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.842	0.563
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.962	0.289
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	1.039	0.545
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.829	0.339
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.578	0.224

5

Таблица 17.5

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в ТА (передняя большеберцовая мышца) мышей из примера 5, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	ТА, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.434
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.664	0.653

	ТА, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.627	0.192
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.609	0.537
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.786	0.119
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.724	0.348
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.642	0.208
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.539	0.170

Таблица 17.6

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в трапециевидных мышцах мышей из примера 5, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трапециевидная мышца	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.307
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	2.968	0.377
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	1.331	0.190
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.961	0.803
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	1.050	0.306
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	1.159	0.382
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.942	0.387
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	1.244	0.337

5

Таблица 17.7. Средняя относительная экспрессия *DUX4* в трицепсах мышей из примера 6, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трицепс, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.207

	Трицепс, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.774	0.214
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.640	0.292
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.500	0.490
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.705	0.132
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.642	0.274
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.629	0.301
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.523	0.215

Чтобы дополнительно проиллюстрировать уровни ингибирования, данные, указанные выше в таблицах с 17.1 по 17.7, сравнивали исключительно с группой положительного контроля (только тамоксифен), чтобы показать % нокдауна или снижения уровня *DUX4* (не относящегося к экспрессии) для различных групп.

Таблица 18.1

Процент нокдауна *DUX4* в бицепсах мышей из примера 6 по сравнению с положительным контролем (только тамоксифен) (группа 2).

Бицепс, день 22	% нокдауна <i>DUX4</i>
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.491
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.572
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.370
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.732
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.441
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.605

Таблица 18.2

Процент нокдауна *DUX4* в диафрагме мышей из примера 6 по сравнению с положительным контролем (только тамоксифен) (группа 2).

Диафрагма, день 22	% нокдауна <i>DUX4</i>
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.484
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.577
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.462
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.473
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.463

Диафрагма, день 22	% нокдауна <i>DUX4</i>
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511- ФК/ФД)	0.650

Таблица 18.3

Процент нокдауна *DUX4* в икроножных мышцах мышей примера 6 по сравнению с положительным контролем (только тамоксифен) (группа 2).

Икроножная мышца, день 22	% нокдауна <i>DUX4</i>
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.456
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511- ФК/ФД)	0.716
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778- ФК/ФД)	0.551
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778- ФК/ФД)	0.553
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511- ФК/ФД)	0.701
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511- ФК/ФД)	0.692

5

Таблица 18.4

Процент нокдауна *DUX4* в жевательных мышцах мышей из примера 6 по сравнению с положительным контролем (только тамоксифен) (группа 2).

Жевательные мышцы, день 22	% нокдауна <i>DUX4</i>
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.183
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511- ФК/ФД)	0.388
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778- ФК/ФД)	0.301
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778- ФК/ФД)	0.245
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511- ФК/ФД)	0.398
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511- ФК/ФД)	0.580

10

Таблица 18.5

Процент нокдауна *DUX4* в ТА (передняя большеберцовая мышца) мышей из примера 6 по сравнению с положительным контролем (только тамоксифен) (группа 2).

ТА, день 22	% нокдауна <i>DUX4</i>
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.623
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511- ФК/ФД)	0.634
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778- ФК/ФД)	0.527
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778- ФК/ФД)	0.565
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511- ФК/ФД)	0.614
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511- ФК/ФД)	0.676

Таблица 18.6

Процент нокдауна *DUX4* в трапециевидных мышцах мышей из примера 6 по сравнению с положительным контролем (только тамоксифен) (группа 2).

Трапециевидная мышца, день 22	% нокдауна <i>DUX4</i>
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.552
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.676
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.646
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.610
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.683
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.581

5 Таблица 18.7

Процент нокдауна *DUX4* в трицепсах мышей из примера 6 по сравнению с положительным контролем (только тамоксифен) (группа 2).

Трицепс, день 22	% нокдауна <i>DUX4</i>
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.639
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.718
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.602
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.638
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.645
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.705

10 Средние относительные уровни транскриптов мРНК *Wfdc3* в собранной ткани определяли аналогичным образом, как показано в следующих таблицах для различных типов мышц:

Таблица 19.1

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в бицепсах мышей из примера 6, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Бицепс, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.868	6.549
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	21.742	2.185	2.429
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	10.061	2.600	3.506
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	3.302	1.613	3.154
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	4.360	2.022	3.769

	Бицепс, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778- ФК/ФД)	0.778	0.318	0.538
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511- ФК/ФД)	9.153	3.716	6.257
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511- ФК/ФД)	5.444	2.062	3.319

Таблица 19.2

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в диафрагме мышей из примера 6, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Диафрагма, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.747	2.954
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	19.044	3.445	4.206
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	6.596	2.343	3.634
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511- ФК/ФД)	0.640	0.393	1.016
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778- ФК/ФД)	1.688	0.839	1.668
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778- ФК/ФД)	0.108	0.049	0.088
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511- ФК/ФД)	5.007	2.475	4.895
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511- ФК/ФД)	1.127	0.542	1.044

5

Таблица 19.3

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в икроножных мышцах мышей из примера 6, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Икроножная мышца, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.773	3.403
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	8.502	1.568	1.923

	Икроножная мышца, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	3.528	0.689	0.857
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.787	0.415	0.877
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	1.238	0.472	0.763
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.213	0.100	0.189
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	2.801	0.666	0.873
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	1.707	0.455	0.620

Таблица 19.4

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в жевательных мышцах мышей из примера 6, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Жевательная мышца, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.766	3.276
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	10.813	4.217	6.913
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	4.561	1.194	1.618
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.854	0.563	1.653
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	1.391	0.400	0.561
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.141	0.065	0.122
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	2.251	0.824	1.299
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	0.778	0.450	1.065

Таблица 19.5

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в ТА (передняя большеберцовая мышца) мышей из примера 6, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	ТА, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.866	6.475
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	23.367	3.417	4.002
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	5.417	1.188	1.521
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	1.153	0.647	1.474
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	1.800	0.639	0.990
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.263	0.122	0.229
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	4.666	1.699	2.672
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	2.429	0.512	0.650

5

Таблица 19.6

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в трапециевидных мышцах мышей из примера 6, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трапециевидная мышца, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.820	4.552
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	20.944	3.702	4.497
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	4.452	1.705	2.763
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.586	0.386	1.128
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	1.072	0.503	0.949
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.122	0.060	0.119
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	3.512	1.804	3.709
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	1.000	0.538	1.162

Таблица 19.7

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в трицепсах мышей из примера 6, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трицепс, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.810	4.255
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	23.534	5.125	6.552
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	4.148	1.492	2.330
Группа 4 (5 мг/кг SM45b-AD07511-ФК/ФД)	0.796	0.449	1.028
Группа 11 (1 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	1.006	0.550	1.212
Группа 12 (5 мг/кг SM45b-AD07778-ФК/ФД)	0.136	0.053	0.087
Группа 13 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	3.284	1.485	2.712
Группа 14 (5 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07511-ФК/ФД)	1.241	0.633	1.290

5

Для агентов РНКи DUX4, указанных выше в таблицах данных, AD07511 включал нуклеотидные последовательности, предназначенные для ингибирования гена *DUX4* в положении 1437 гена, и AD077778 включал нуклеотидные последовательности, предназначенные для ингибирования гена *DUX4* в положении 408 гена.

10

Как показано выше, оба этих агента РНКи DUX4 сохраняли массу тела и продемонстрировали значительное снижение экспрессии гена *DUX4*.

Пример 7

Введение in vivo агентов РНКи, направленных на *DUX4*, у трансгенных мышей с FSHD-подобным синдромом.

15

Использовали FSHD-подобную модель трансгенных мышей, как описано в примере 2, для оценки агентов РНКи DUX4. Агенты РНКи DUX4, которые включали смысловую цепь и антисмысловую цепь, синтезировали в соответствии с фосфорамидитной технологией на твердой фазе в соответствии с общими процедурами, известными в данной области техники и обычно

20

используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как указано в примере 1 в данном контексте.

В день исследования 1 мышам вводили инъекции между кожей и мышцами (т. е. подкожные инъекции) в область дряблой кожи над областью шеи и плеч либо изотонического солевого раствора (контроль носителя), либо агента РНКи DUX4, приготовленного в изотоническом солевом растворе. Начиная с дня 4, три раза в неделю (дни 4, 6, 8, 10, 12, 15, 17 и 19) через зонд мышам вводили 100 мкл/20 г либо кукурузного масла (отрицательный контроль), либо тамоксифена, растворенного в кукурузном масле (1 мг/мл), чтобы вызвать повышенную экспрессию *DUX4*. Схема дозировки и подробности приведены в следующей таблице.

Таблица 20

Группы дозировки мышей из примера 7.

Группа	Агент РНКи и доза	Схема дозировки агента РНКи	Агент для введения	Схема дозировки агента для введения
1	Исходный уровень (без агента РНКи, инъекция физиологического раствора)	н/о	Кукурузное масло (отрицательный контроль)	3 раза в неделю, начиная с дня 4
2	Положительный контроль (без агента РНКи, инъекция физиологического раствора)	н/о	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
3	$\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP38b	1 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
4	$\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP38b	5 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
5	$\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07776-LP38b	1 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4

Группа	Агент РНКи и доза	Схема дозировки агента РНКи	Агент для введения	Схема дозировки агента для введения
6	$\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07776-LP38b	5 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4

Агенты РНКи в примере 7 (группы 3-6) синтезировали с нуклеотидными последовательностями, направленными на ген *DUX4*, и включали функционализованную реакционноспособную аминогруппу (NH₂-C6) на 5'-конце смысловой цепи для ускорения конъюгирования с пептидом рецептора клеток скелетных мышц, называемым пептидом 1 (см., например, выше пример 6 для получения информации о структуре и сопутствующей информации).

Агенты РНКи *DUX4* в примере 7 дополнительно синтезировали с дисульфидной функциональной группой (C6-SS-C6) на 3'-конце смысловой цепи для ускорения конъюгирования с модулятором ФК/ФД (LP38b) (см., например, выше приведенный пример 6 для получения информации о структуре и сопутствующей информации).

Нуклеотидные последовательности модифицированного агента РНКи синтезировали, как показано в данном контексте в таблице 3, таблице 4.1, таблице 4.6, а также в таблице 5.1, таблице 5.2, таблице 5.3 и таблице 5.4 (показаны полностью модифицированные конъюгаты).

Для агентов РНКи *DUX4*, показанных выше, AD07511 (группы 3 и 4) включал нуклеотидные последовательности, предназначенные для ингибирования гена *DUX4* в положении 1437 гена, и AD07776 (группы 5 и 6) включал нуклеотидные последовательности, предназначенные для ингибирования гена *DUX4* в положении 408 гена.

Измерения массы тела проводили в дни 1, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 12, 15, 17, 18 и 19 и были нормализованы к 1-му дню (до введения тамоксифена) и исходному уровню, как показано на фиг. 7. Масса тела сохранялась выше уровней положительного контроля во всех группах, получавших 1 или 5 мг/кг агента РНКи.

Шести мышам вводили дозу в каждой группе (n=6). На день 19 животных умерщвляли, а мышцы собирали, обрабатывали и анализировали в соответствии

с процедурами, описанными в примере 2. Средняя относительная экспрессия *DUX4* в собранной ткани показана в следующих таблицах для икроножных и трехглавых мышц.

Таблица 21.1

- 5 Средняя относительная экспрессия *DUX4* в икроножных мышцах мышей из примера 7, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Икроножная мышца, день 19	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.215
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.486	0.325
Группа 3 (AD07511, 1 мг/кг)	0.919	0.200
Группа 4 (AD07511, 5 мг/кг)	0.879	0.241
Группа 5 (AD07776, 1 мг/кг)	1.474	0.615
Группа 6 (AD07776, 5 мг/кг)	1.136	0.540

Таблица 21.2

- 10 Средняя относительная экспрессия *DUX4* в трицепсах мышей из примера 7, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трицепс, день 19	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.217
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.654	0.675
Группа 3 (AD07511, 1 мг/кг)	0.777	0.091
Группа 4 (AD07511, 5 мг/кг)	0.968	0.620
Группа 5 (AD07776, 1 мг/кг)	1.145	0.285
Группа 6 (AD07776, 5 мг/кг)	0.968	0.620

Средние относительные уровни транскриптов мРНК *Wfdc3* в собранной ткани определяли аналогичным образом, как показано в следующих таблицах для икроножных мышц и трицепсов.

Таблица 22.1

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в икроножных мышцах мышей из примера 7, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Икроножная мышца, день 19		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.810	4.259
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	7.684	3.764	7.376
Группа 3 (AD07511, 1 мг/кг)	5.999	1.891	2.762
Группа 4 (AD07511, 5 мг/кг)	2.742	0.649	0.851
Группа 5 (AD07776, 1 мг/кг)	3.628	0.735	0.922
Группа 6 (AD07776, 5 мг/кг)	1.537	0.467	0.672

5 Таблица 22.2. Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в трицепсе мышей из примера 7, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трицепс, день 19		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Контрольная группа)	1.000	0.899	8.915
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	16.942	4.319	5.797
Группа 3 (AD07511, 1 мг/кг)	5.014	1.291	1.738
Группа 4 (AD07511, 5 мг/кг)	0.958	0.396	0.676
Группа 5 (AD07776, 1 мг/кг)	1.334	0.668	1.339
Группа 6 (AD07776, 5 мг/кг)	0.131	0.071	0.156

Чтобы дополнительно проиллюстрировать уровни ингибирования, данные, указанные выше в таблицах 22.1 и 22.2, сравнивали исключительно с группой положительного контроля (только тамоксифен), что показало следующие относительные уровни ингибирования для различных групп.

Таблица 23.1. Относительную среднюю экспрессию *Wfdc3* в икроножных мышцах мышей из примера 7 нормализовали до положительного контроля (группа 2).

	Икроножные мышцы, день 22
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.000

	Икроножные мышцы, день 22
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>
Группа 3 (AD07511, 1 мг/кг)	0.781
Группа 4 (AD07511, 5 мг/кг)	0.357
Группа 5 (AD07776, 1 мг/кг)	0.472
Группа 6 (AD07776, 5 мг/кг)	0.200

Таблица 23.2. Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в трицепсе мышей из примера 7, нормализованная по отношению к положительному контролю (группа 2).

	Трицепс, день 22
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.000
Группа 3 (AD07511, 1 мг/кг)	0.296
Группа 4 (AD07511, 5 мг/кг)	0.057
Группа 5 (AD07776, 1 мг/кг)	0.079
Группа 6 (AD07776, 5 мг/кг)	0.008

5

Мышей в примере 7 дополнительно подвергали воздействию аппарата Rotarod для проведения оценки крупной моторной координации, как описано выше в примере 2. Как показано на фиг. 8, на протяжении всего исследования животные, которым вводили агенты РНКи DUX4 (группы 3–6), были способны поддерживать равновесие и общую двигательную функцию на аппарате Rotarod, как и в группе с отрицательным контролем, в которой применяли физиологический раствор и не вводили тамоксифен. И наоборот, животные, получавшие тамоксифен, но не получавшие агента РНКи DUX4, выпадали из аппарата Rotarod намного быстрее, начиная примерно с дня 11, что указывает на потерю мышечной функции.

15

Как свидетельствуют показанные выше данные, оба агента РНКи DUX4 демонстрируют существенное ингибирование экспрессии гена *DUX4* и сохранение общей двигательной функции и массы тела у модельных мышей, которым вводили агенты РНКи DUX4.

Пример 8

Введение in vivo агентов РНКи, направленных на *DUX4*, у трансгенных мышей с FSHD-подобным синдромом.

Использовали FSHD-подобную модель трансгенных мышей, как описано в примере 2, для оценки агентов РНКи *DUX4*. Агенты РНКи *DUX4*, которые включали смысловую цепь и антисмысловую цепь, синтезировали в соответствии с фосфорамидитной технологией на твердой фазе в соответствии с общими процедурами, известными в данной области техники и обычно используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как указано в примере 1 в данном контексте.

В день исследования 1 мышам вводили инъекции между кожей и мышцами (т. е. подкожные инъекции) в область дряблой кожи над областью шеи и плеч либо изотонического солевого раствора (контроль носителя), либо агента РНКи *DUX4*, приготовленного в изотоническом солевом растворе. Начиная с дня 4, три раза в неделю (дни 4, 6, 8, 10, 12, 15, 17 и 19) через зонд вводили мышам 100 мкл/20 г либо кукурузного масла (отрицательный контроль), либо тамоксифена, растворенного в кукурузном масле (1 мг/мл), чтобы вызвать повышенную экспрессию *DUX4*. Схема дозирования и подробности приведены в следующей таблице.

Таблица 24

Группы дозирования для мышей из примера 8.

Группа	Агент РНКи и доза	Схема дозирования агента РНКи	Агент для введения	Схема дозирования агента для введения
1	Исходный уровень (без агента РНКи, инъекция физиологического раствора)	н/о	Кукурузное масло (отрицательный контроль)	3 раза в неделю, начиная с дня 4
2	Положительный контроль (без агента РНКи, инъекция физиологического раствора)	н/о	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
3	SM45b-L4-AD07511-Бис(ПЭГ47+C22)	1 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4

Группа	Агент РНКи и доза	Схема дозировки агента РНКи	Агент для введения	Схема дозировки агента для введения
4	SM45b-L4-AD07778-Бис(ПЭГ47+C22)	1 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
5	$\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP29b	1 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
6	$\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29b	1 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
7	$\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP38b	1 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4
8	$\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07578-LP38b	1 мг/кг вводили в дни 1 и 7	Тамоксифен	3 раза в неделю, начиная с дня 4

Агенты РНКи в примере 8 (группы 3-8) синтезировали с нуклеотидными последовательностями, направленными на ген *DUX4*, и включали функционализованную реакционноспособную аминогруппу (NH₂-C6) на 5'-конце смысловой цепи для ускорения конъюгирования с соответствующим направляющим лигандом или линкером.

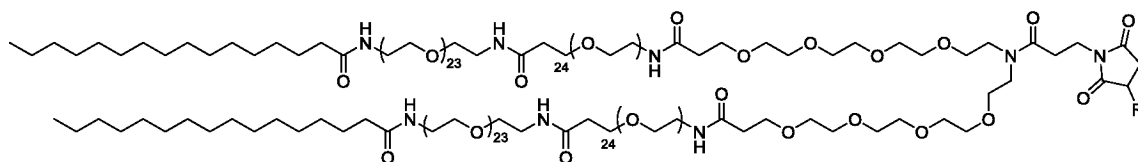
Для групп 3-4 выбранным направляющим лигандом являлся низкомолекулярный рецептор скелетных мышц SM45b, который синтезировали в форме азида, что позволяло оптимально связываться с линкером L4 (см., например, выше приведенный пример 3 для получения информации о структуре и связанной информации для SM45-р и L4).

Для групп 5–8 пептид 1 конъюгировали со смысловой цепью агента РНКи DUX4. Пептид 1 являлся связанным с агентом РНКи, функционализированным (NH₂-C6), посредством реакции конденсации амида на 5'-конце смысловой цепи (см. информацию о структуре в примере 6).

Агенты РНКи DUX4 в примере 6 дополнительно синтезировали с дисульфидной функциональной группой (C6-SS-C6) на 3'-конце смысловой цепи для ускорения конъюгирования с модулятором ФК/ФД.

Для групп 3-4 фрагмент Бис(ПЭГ47+C22) присоединяли к 3'-концу смысловой цепи, чтобы использовать в качестве фармакокинетического/фармакодинамического (ФК/ФД) модулятора (см., например, выше приведенный пример 3 для получения информации о структуре и сопутствующей информации).

Для групп 5-6 фрагмент LP29b присоединяли к 3'-концу смысловой нити, чтобы использовать в качестве фармакокинетического/фармакодинамического (ФК/ФД) модулятора, имеющего следующую структуру:



где R содержит агент РНКи DUX4.

LP29-р являлся связанным с 3'-концом смысловой цепи с использованием восстановления терминальной 3'-дисульфидной связи функциональной группы (C6-SS-C6) и связывания малеимида LP29-р с концевым 3'-тиолом с помощью реакции присоединения по Михаэлю. Для групп 7-8 фрагмент LP38b присоединяли к 3'-концу смысловой нити, чтобы использовать в качестве фармакокинетического/фармакодинамического (ФК/ФД) модулятора (см., например, выше приведенный пример 6 для получения информации о структуре и связанной информации).

Нуклеотидные последовательности модифицированного агента РНКи синтезировали, как показано в данном контексте в таблице 3, таблице 4.1, таблице 4.6, а также таблице 5.1, таблице 5.2, таблице 5.3 и таблице 5.4 (показаны полностью модифицированные конъюгаты).

Девяти мышам вводили дозу в каждой группе (n=9), за исключением группы положительного контроля (тамоксифен и физиологический раствор, без введения агента РНКи DUX4), в которой было 12 мышей (n=12). На день 22 животных забивали, мышцы собирали, обрабатывали и анализировали в соответствии с процедурами, описанными в примере 2.

Измерения массы тела проводили в дни 1, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 15, 17, 19 и 22 и нормализовали к дню 4 (до введения тамоксифена) и к исходному уровню, как показано на фиг. 9.

Исследовали среднюю относительную экспрессию *DUX4* в собранной ткани, как показано в следующих таблицах для различных типов мышц.

Таблица 25.1

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в бицепсах мышей из примера 8, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Бицепс, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.831
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.311	0.478
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-Бис(ПЭГ47+C22))	0.705	0.313
Группа 4 (1 мг/кг SM45b-AD07778-Бис(ПЭГ47+C22))	0.788	0.254
Группа 5 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP29b)	0.399	0.172
Группа 6 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29b)	0.405	0.262
Группа 7 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP38b)	0.580	0.275
Группа 8 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP38b)	0.374	0.228

Таблица 25.2

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в диафрагме мышей из примера 8, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Диафрагма, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.373
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	2.628	0.681
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-Бис(ПЭГ47+C22))	0.926	0.353
Группа 4 (1 мг/кг SM45b-AD07778-Бис(ПЭГ47+C22))	1.098	0.366
Группа 5 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP29b)	0.990	0.360

	Диафрагма, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 6 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29b)	0.866	0.372
Группа 7 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP38b)	1.053	0.333
Группа 8 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP38b)	0.787	0.382

Таблица 25.3

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в икроножных мышцах мышей из примера 8, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Икроножная мышца, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.328
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	2.274	0.757
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-Бис(ПЭГ47+C22))	0.585	0.207
Группа 4 (1 мг/кг SM45b-AD07778-Бис(ПЭГ47+C22))	0.764	0.162
Группа 5 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP29b)	0.615	0.218
Группа 6 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29b)	0.631	0.212
Группа 7 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP38b)	0.705	0.239
Группа 8 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP38b)	0.727	0.330

5

Таблица 25.4

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в жевательных мышцах мышей из примера 8, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Жевательная мышца, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.300
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.330	0.318

	Жевательная мышца, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-Бис(ПЭГ47+C22))	0.852	0.243
Группа 4 (1 мг/кг SM45b-AD07778-Бис(ПЭГ47+C22))	0.876	0.221
Группа 5 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP29b)	0.533	0.111
Группа 6 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29b)	0.534	0.068
Группа 7 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP38b)	0.613	0.248
Группа 8 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP38b)	0.610	0.156

Таблица 25.5

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в ТА (передняя большеберцовая мышца) мышей из примера 8, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	ТА, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.211
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.516	0.297
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-Бис(ПЭГ47+C22))	0.616	0.195
Группа 4 (1 мг/кг SM45b-AD07778-Бис(ПЭГ47+C22))	0.654	0.159
Группа 5 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP29b)	0.484	0.167
Группа 6 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29b)	0.573	0.303
Группа 7 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP38b)	0.495	0.218
Группа 8 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP38b)	0.556	0.184

Таблица 25.6

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в трапециевидных мышцах мышей из примера 8, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трапециевидная мышца, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.340
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	2.181	0.466
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-Бис(ПЭГ47+C22))	0.508	0.233
Группа 4 (1 мг/кг SM45b-AD07778-Бис(ПЭГ47+C22))	0.622	0.277
Группа 5 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP29b)	0.562	0.179
Группа 6 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29b)	0.567	0.214
Группа 7 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP38b)	0.603	0.322
Группа 8 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP38b)	0.633	0.218

5

Таблица 25.7

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в трицепсах мышей из примера 8, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трицепс, день 22	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.387
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	2.331	1.000
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511-Бис(ПЭГ47+C22))	0.508	0.243
Группа 4 (1 мг/кг SM45b-AD07778-Бис(ПЭГ47+C22))	0.649	0.109
Группа 5 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP29b)	0.569	0.189
Группа 6 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29b)	0.601	0.265
Группа 7 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP38b)	0.679	0.300
Группа 8 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP38b)	0.848	0.359

Средние относительные уровни транскриптов мРНК *Wfdc3* в собранной ткани определяли, аналогичным образом, как показано в следующих таблицах для различных типов мышц.

Таблица 26.1

- 5 Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в бицепсах мышей из примера 6, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Бицепс, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.821	4.586
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	16.434	2.039	2.327
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511- Бис(ПЭГ47+C22))	4.778	2.175	3.994
Группа 4 (1 мг/кг SM45b-AD07778- Бис(ПЭГ47+C22))	3.760	1.353	2.114
Группа 5 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP29b)	6.146	1.610	2.181
Группа 6 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29b)	2.722	1.090	1.819
Группа 7 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP38b)	6.513	2.463	3.962
Группа 8 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP38b)	3.041	1.072	1.655

Таблица 26.2

- 10 Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в диафрагме мышей из примера 6, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Диафрагма, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.769	3.338
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	21.913	2.959	3.421
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511- Бис(ПЭГ47+C22))	4.848	2.284	4.320
Группа 4 (1 мг/кг SM45b-AD07778- Бис(ПЭГ47+C22))	2.795	1.346	2.598
Группа 5 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP29b)	5.240	1.774	2.682
Группа 6 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29b)	1.306	0.621	1.185

	Диафрагма, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 7 (1 мг/кг $\alpha\beta6$ пептид 1-AD07511-LP38b)	5.245	2.932	6.646
Группа 8 (1 мг/кг $\alpha\beta6$ пептид 1-AD07778-LP38b)	1.618	1.003	2.642

Таблица 26.3

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в икроножных мышцах мышей из примера 6, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Икроножная мышца, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.674	2.064
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	8.357	1.679	2.102
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511- Бис(ПЭГ47+C22))	2.326	0.537	0.698
Группа 4 (1 мг/кг SM45b-AD07778- Бис(ПЭГ47+C22))	1.455	0.464	0.681
Группа 5 (1 мг/кг $\alpha\beta6$ пептид 1-AD07511-LP29b)	2.382	0.597	0.797
Группа 6 (1 мг/кг $\alpha\beta6$ пептид 1-AD07778-LP29b)	1.130	0.420	0.669
Группа 7 (1 мг/кг $\alpha\beta6$ пептид 1-AD07511-LP38b)	2.440	0.814	1.221
Группа 8 (1 мг/кг $\alpha\beta6$ пептид 1-AD07778-LP38b)	1.126	0.468	0.800

5

Таблица 26.4

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в жевательных мышцах мышей из примера 6, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Жевательная мышца, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.724	2.625
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	9.662	1.776	2.175
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511- Бис(ПЭГ47+C22))	2.818	0.911	1.347

	Жевательная мышца, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 4 (1 мг/кг SM45b-AD07778- Бис(ПЭГ47+C22))	1.574	0.598	0.965
Группа 5 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP29b)	1.716	0.602	0.928
Группа 6 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29b)	0.700	0.294	0.507
Группа 7 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP38b)	1.836	0.884	1.704
Группа 8 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP38b)	0.570	0.271	0.516

Таблица 26.5

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в ТА (передняя большеберцовая мышца) мышей из примера 6, нормированная исходному уровню производительности (группа 1).

5

	ТА, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.825	4.714
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	16.122	2.924	3.571
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511- Бис(ПЭГ47+C22))	3.474	1.193	1.817
Группа 4 (1 мг/кг SM45b-AD07778- Бис(ПЭГ47+C22))	1.697	0.618	0.971
Группа 5 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP29b)	4.008	0.925	1.202
Группа 6 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29b)	1.539	0.793	1.634
Группа 7 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP38b)	4.097	1.537	2.459
Группа 8 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP38b)	1.553	0.560	0.876

Таблица 26.6

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в трапециевидных мышцах мышей из примера 6, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трапециевидная мышца, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.757	3.112
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	13.635	2.965	3.790
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511- Бис(ПЭГ47+C22))	1.929	1.009	2.115
Группа 4 (1 мг/кг SM45b-AD07778- Бис(ПЭГ47+C22))	1.222	0.553	1.010
Группа 5 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP29b)	1.834	0.609	0.911
Группа 6 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29b)	0.552	0.272	0.534
Группа 7 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP38b)	2.258	1.166	2.410
Группа 8 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP38b)	0.632	0.321	0.651

5

Таблица 26.7

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в трицепсах мышей из примера 6, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трицепс, день 22		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.648	1.842
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	13.188	2.581	3.209
Группа 3 (1 мг/кг SM45b-AD07511- Бис(ПЭГ47+C22))	1.742	0.614	0.948
Группа 4 (1 мг/кг SM45b-AD07778- Бис(ПЭГ47+C22))	0.792	0.427	0.926
Группа 5 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP29b)	1.702	0.573	0.865
Группа 6 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29b)	0.517	0.229	0.411
Группа 7 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07511-LP38b)	1.606	0.962	2.399
Группа 8 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP38b)	0.590	0.322	0.707

Для агентов РНКи DUX4, указанных в приведенных выше таблицах данных, AD07511 включал нуклеотидные последовательности, предназначенные для ингибирования гена *DUX4* в положении 1437 гена, и AD077778 включал нуклеотидные последовательности, предназначенные для ингибирования гена *DUX4* в положении 408 гена.

Как показано выше, оба этих агента РНКи DUX4 демонстрируют значительное снижение экспрессии гена *DUX4* в каждом из трех исследованных форматах.

Пример 9

Введение in vivo агентов РНКи, направленных на DUX4, у трансгенных мышей с FSHD-подобным синдромом.

Использовали FSHD-подобную модель трансгенных мышей, как описано в примере 2. Исследуемым агентом РНКи DUX4 являлся агент РНКи DUX4 AD077778, связанный с направляющим лигандом пептида 1 и модулятором ФК/ФД LP29b (см. AC000448 в таблице 5.4 для полностью модифицированной и конъюгированной структуры смысловой и антисмысловой цепи), который синтезировали в соответствии с фосфорамидитной технологией на твердой фазе в соответствии с общими процедурами, известными в данной области техники и обычно используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как указано в примере 1 в данном контексте.

Цель этого исследования состояла в том, чтобы оценить реакцию на дозу и временной эффект указанного агента РНКи DUX4 на нокдаун экспрессии мРНК DUX4, снижение уровня биомаркеров активности белка DUX4 и фармакодинамический эффект после подкожной дозы дважды в неделю с последующим еженедельным введением подкожной дозы у мышей FLExDUX4/HSA-MCM.

В исследовании проводили две стратегии введения: профилактика и вмешательство.

При проведении стратегии профилактики (группы C и D ниже) агент РНКи DUX4 вводили в течение 2 дней после начала введения тамоксифена. Таким образом, агент РНКи DUX4, предположительно, доставляется в клетки скелетных мышц (миофибриллы), поскольку экспрессия *DUX4* индуцируется и повышается.

При проведении стратегии вмешательства (группа Е ниже) агент РНКи DUX4 вводили после проявления FSHD-подобного фенотипа (ко дню 10 после начала введения тамоксифена). Таким образом, агент РНКи DUX4 был доставлен в миофибриллы после того, как экспрессия *DUX4* уже начала приводить к

5

миотоксическому эффекту.

Схема дозировки и подробная информация представлены в следующей таблице 27.

Таблица 27

Группы дозировки мышей из примера 9.

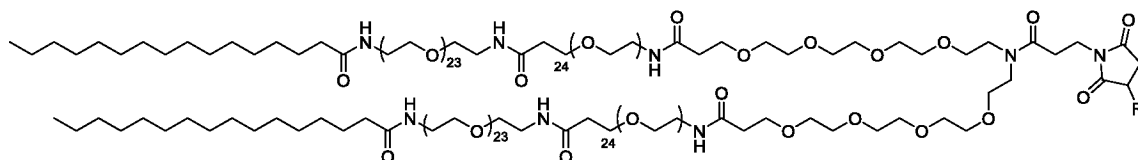
Группа	Агент РНКи и доза	Схема дозировки агента РНКи	Агент для введения	Схема дозировки агента для введения
А	Исходный уровень (без агента РНКи, инъекция физиологического раствора)	н/о	Кукурузное масло (отрицательный контроль)	День 1, затем 2 раза в неделю в течение первой недели и 3 раза в неделю, начиная с недели 2
В	Положительный контроль (без агента РНКи, инъекция физиологического раствора)	н/о	Тамоксифен	День 1, затем 2 раза в неделю в течение первой недели и 3 раза в неделю, начиная с недели 2
С	(Профилактическое исследование) $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29b	1 мг/кг вводили в дни 3, 5, 10, 17 и 25	Тамоксифен	День 1, затем 2 раза в неделю в течение первой недели и 3 раза в неделю, начиная с недели 2
Д	(Профилактическое исследование) $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29b	5 мг/кг вводили в дни 3, 5, 10, 17 и 25	Тамоксифен	День 1, затем 2 раза в неделю в течение первой недели и 3 раза в неделю, начиная с недели 2

Группа	Агент РНКи и доза	Схема дозирования агента РНКи	Агент для введения	Схема дозирования агента для введения
Е	(Интервенционное исследование) Физиологический раствор (без агента РНКи) для первых двух доз с последующим введением пептида 1-AD07778-LP29b	Физиологический раствор (без агента РНКи) вводили в дни 3 и 5. 5 мг/кг агента РНКи вводили в дни 10, 17 и 25.	Тамоксифен	День 1, затем 2 раза в неделю в течение первой недели и 3 раза в неделю, начиная с недели 2

Каждой мыши вводили контрольный препарат кукурузного масла или раствор тамоксифена (1 мг/мл) через пероральный желудочный зонд в объеме дозы 100 мкл на 20 г веса тела (5 мг/кг) дважды в неделю в течение недели 1 и три раза в неделю с недели 2 по неделю 4.

Агент РНКи в примере 9 (группы С, D и Е) синтезировали с нуклеотидными последовательностями, направленными на ген *DUX4*, и он включал функционализованную реакционноспособную аминогруппу (NH₂-C6) на 5'-конце смысловой цепи для ускорения конъюгирования с соответствующим направляющим лигандом или линкером. Пептид 1 конъюгировали со смысловой цепью агента РНКи DUX4. Пептид 1 являлся связанным с агентом РНКи, функционализированным (NH₂-C6), с использованием реакции конденсации амида на 5'-конце смысловой цепи (см. информацию о структуре в примере 6).

Агенты РНКи DUX4 в примере 6 дополнительно синтезировали с дисульфидной функциональной группой (C6-SS-C6) на 3'-конце смысловой цепи для ускорения конъюгирования с модулятором ФК/ФД. Фрагмент LP29b присоединяли к 3'-концу смысловой нити и использовали в качестве фармакокинетического/фармакодинамического (ФК/ФД) модулятора, имеющего следующую структуру:



где R содержит агент РНКи DUX4.

Малеимид LP29-р являлся связанным с 3'-концом смысловой цепи с использованием восстановления терминальной 3'-дисульфидной связи и

проведения присоединения по Михаэлю к терминальному 3'-тиолу с целью синтеза агента РНКи.

Нуклеотидные последовательности модифицированного агента РНКи синтезировали, как указано в данном контексте в таблице 3, таблице 4.1, таблице 4.6, а также таблице 5.1, таблице 5.2, таблице 5.3 и таблице 5.4 (показаны полностью модифицированные конъюгаты).

Шести мышам вводили дозы в группе А (n=6), которая не включала тамоксифен. Десяти мышам вводили дозы в группах В, С, D и Е (n=10).

Измерения веса тела проводили в дни введения тамоксифена и агента РНКи (дни 1, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 17, 19, 22, 24, 26, 29 и 31). Для контроля индивидуальных различий вес тела каждого отдельного животного нормализовали к дню 1, а затем к среднему значению веса тела исходной группы в каждый момент времени. Двусторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом множественных сравнений Даннета использовали для определения значительных различий в весе тела в группах в каждый момент времени.

Вес тела существенно не различался между группами до дня 10. На день 10 животные, которым вводили тамоксифен, имели тенденцию демонстрировать более низкий вес тела по сравнению с исходным уровнем и характеризовались значительно более низким весом тела, чем те, которым вводили 1 или 5 мг/кг агента РНКи, начиная с дня 3 (группы С и D, $p=0,0294$, $p=0,0010$ и $p=0,0012$, соответственно). Ко дню 12 животные, которым вводили только тамоксифен (группа В), и группа, получавшая тамоксифен и 5 мг/кг агента РНКи, вводившиеся впервые на день 10 (группа Е), отличались значительно более низким весом тела по сравнению с исходными животными (группа А) и теми, которым вводили 1 или 5 мг/кг на день 3 (группы С и D). На день 17 потеря веса тела прекратилась у животных, получавших лечение в группе Е, в то время как потеря веса тела продолжалась у животных, которым вводили только тамоксифен (группа В). В то время как средний вес тела в группе Е оказался значительно ниже исходного уровня и уровня у животных, которым вводили 1 или 5 мг/кг агента РНКи DUX4, начиная с дня 3 (группы А, С и D, $p < 0,05$ для всех соответствующих сравнений), он также оказался значительно выше, чем средний вес тела животных, которым вводили только тамоксифен (группа В, $p = 0,0003$). После 22-го дня вес тела животных в группе Е, которым вводили агент

РНКи DUX4, начиная с дня 10, оставался статистически равным группе С и D до 31 дня.

В день 31 животных забивали, а мышцы собирали, обрабатывали и анализировали в соответствии с процедурами, описанными в примере 2.

- 5 Исследовали среднюю относительную экспрессию *DUX4* в собранной ткани, как показано в следующих таблицах для различных типов мышц.

Таблица 28.1

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в бицепсах мышей из примера 9, нормализованная к исходному уровню (группа А).

	Бицепс, день 31	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа А (Исходный уровень)	1.000	0.306
Группа В (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.929	0.794
Группа С (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29)	0.868	0.255
Группа D (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29)	1.050	0.327
Группа Е (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29 получала инъекции, начиная со дня 10, после двух доз физиологического раствора на день 3 и 5	0.715	0.223

10

Таблица 28.2

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в икроножных мышцах мышей из примера 9, нормализованная к исходному уровню (группа А).

	Икроножная мышца, день 31	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа А (Исходный уровень)	1.000	0.283
Группа В (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.912	1.101
Группа С (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29)	0.888	0.455
Группа D (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29)	0.716	0.288
Группа Е (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29 получала инъекции, начиная со дня 10, после двух доз физиологического раствора на день 3 и 5	0.789	0.419

Таблица 28.3

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в жевательных мышцах мышей из примера 9, нормализованная к исходному уровню (группа А).

	Жевательная мышца, день 31	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа А (Исходный уровень)	1.000	0.246
Группа В (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.444	0.467
Группа С (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29)	0.843	0.410
Группа D (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29)	0.666	0.168
Группа Е (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29 получала инъекции, начиная со дня 10, после двух доз физиологического раствора на день 3 и 5	0.841	0.176

5

Таблица 28.4

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в ТА (передняя большеберцовая мышца) мышей из примера 9, нормализованная к исходному уровню (группа А).

	ТА, день 31	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа А (Исходный уровень)	1.000	0.338
Группа В (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.907	0.808
Группа С (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29)	0.953	0.312
Группа D (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29)	0.834	0.281
Группа Е (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29 получала инъекции, начиная со дня 10, после двух доз физиологического раствора на день 3 и 5	0.808	0.311

Таблица 28.5. Средняя относительная экспрессия *DUX4* в трапецевидных мышцах мышей из примера 9, нормализованная к исходному уровню (группа А).

	Трапецевидная мышца, день 31	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа А (Исходный уровень)	1.000	0.258
Группа В (Положительный контроль (только Тамоксифен))	2.679	2.189
Группа С (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29)	0.931	0.564
Группа D (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29)	0.890	0.241
Группа Е (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29 получала инъекции, начиная со дня 10, после двух доз физиологического раствора на день 3 и 5	0.857	0.199

Таблица 28.6

- 5 Средняя относительная экспрессия *DUX4* в трицепсах мышей из примера 9, нормализованная к исходному уровню (группа А).

	Трицепс, день 31	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа А (Исходный уровень)	1.000	0.227
Группа В (Положительный контроль (только Тамоксифен))	2.565	2.000
Группа С (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29)	0.972	0.358
Группа D (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29)	0.633	0.222
Группа Е (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29 получала инъекции, начиная со дня 10, после двух доз физиологического раствора на день 3 и 5	0.793	0.259

- 10 Средние относительные уровни транскриптов мРНК *Wfdc3* и уровни транскриптов мРНК *Myo1g* в собранной ткани аналогичным образом определяли для различных типов мышц. Все индивидуальные и групповые значения относительной экспрессии *Wfdc3* и *Myo1g* нормализовали к соответствующим средним относительным уровням экспрессии из исходной группы (группа А). Введение тамоксифена (группа В) приводило к резкому и значительному

увеличению экспрессии *Wfdc3* (в 4,891–11,772 раза) и *Myo1g* (в 2,139–12,744 раза) во всех оцениваемых мышцах ($p < 0,001$ для всех соответствующих сравнений). У животных, индуцированных тамоксифеном, пептид 1-AD07778-LP29 агента РНКи DUX4, вводимый в дозе 1 или 5 мг/кг, начиная с дня 3 (группы С и D) и начиная со дня 10 (группа E), предотвращал повышение экспрессии *Wfdc3* и *Myo1g* или снижение относительной экспрессии *Wfdc3* и *Myo1g* до исходного уровня или ниже. Введение агента РНКи DUX4 приводило к тому, что средние относительные уровни экспрессии *Wfdc3* и *Myo1g* оказывались значительно ниже, чем при введении только тамоксифена (группа B), независимо от величины дозы или продолжительности введения (группы С, D и E, $p < 0,0001$ для всех соответствующих сравнений).

Кроме того, проводили гистологический анализ образцов ткани. Мышечные срезы вырезали из фиксированных формалином икроножных мышц, ТА и трицепсов в дни сбора тканей, и окрашивали с использованием H&E и PSR. В икроножных мышцах, ТА и трицепсах введение тамоксифена вызывало резкое увеличение центрально расположенных ядер, что указывает на активное восстановление мышц и фиброз у животных FLExDUX4/HSA-MCM (группа B). Как правило, меньшее количество централизованных ядер и меньший фиброз наблюдали в срезах мышц у животных, которым вводили тамоксифен и агент РНКи DUX4 (группы С, D и E), по сравнению с животными, которым вводили только тамоксифен (группа B). Действительно, срезы мышц животных из групп С, D и E имели морфологию, сходную с таковой из исходной группы (группа A). Животные группы E (получавшие тамоксифен, начиная со дня 1, а затем агент РНКи DUX4, начиная со дня 10), проявляли тенденцию к более выраженному фиброзу, чем животные из групп С и D.

Как показано в данном контексте, введения агента РНКи DUX4 как с использованием стратегии профилактики, так и стратегии вмешательства, было достаточно, чтобы вернуть уровни экспрессии *DUX4* к исходному уровню, предотвратить или уменьшить повышенную экспрессию генов-мишеней *DUX4* и маркеров активности *DUX4* (*Wfdc3* и *Myo1g*), предотвратить потерю веса тела и вернуть вес тела к исходному уровню, а также уменьшить признаки миотоксичности (фиброз, увеличение центральных ядер, повышение уровня креатининкиназы в сыворотке, потеря мышечной массы — в 4 из 9 мышц), тем самым облегчая проявления FSHD-подобного фенотипа, наблюдаемого на

FLExDUX4/HSA-MCM-модели трансгенной мыши при введении тамоксифена через пероральный желудочный зонд.

Пример 10

Введение in vivo агентов РНКи, направленных на *DUX4*, у трансгенных мышей с FSHD-подобным синдромом.

Использовали FSHD-подобную модель трансгенных мышей, как описано в примере 2. Оцениваемым агентом РНКи DUX4 являлся агент РНКи DUX4 AD07778, связанный с направляющим лигандом пептида 1 и модулятором ФК/ФД LP29b (см. AC000448 в таблице 5.4 для полностью модифицированной и конъюгированной структуры смысловой и антисмысловой цепи), который синтезировали в соответствии с фосфорамидитной технологией на твердой фазе в соответствии с общими процедурами, известными в данной области техники и обычно используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как указано в примере 1 в данном контексте.

Схема дозировки и подробная информация представлены в следующей таблице 29.

Таблица 29

Группы дозировки мышей из примера 10.

Группа	Агент РНКи и доза	Схема дозировки агента РНКи	Агент для введения	Схема дозировки агента для введения
1	Исходный уровень (без агента РНКи, инъекция физиологического раствора)	н/о	Кукурузное масло (отрицательный контроль)	День 1, затем 2 раза в неделю в течение первой недели и 3 раза в неделю, начиная с недели 2
2	Положительный контроль (без агента РНКи, инъекция физиологического раствора)	н/о	Тамоксифен	День 1, затем 2 раза в неделю в течение первой недели и 3 раза в неделю, начиная с недели 2

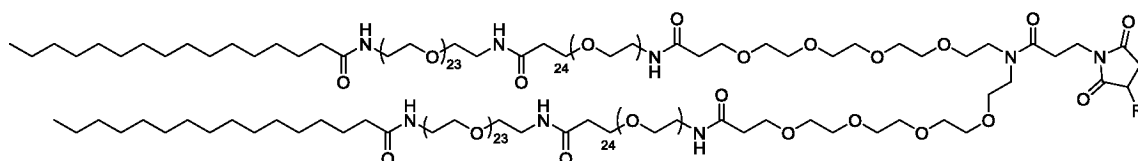
Группа	Агент РНКи и доза	Схема дозирования агента РНКи	Агент для введения	Схема дозирования агента для введения
3	(Профилактическое исследование) $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29b	1 мг/кг вводили в дни 1 и 4	Тамоксифен	День 1, затем 2 раза в неделю в течение первой недели и 3 раза в неделю, начиная с недели 2
4	(Профилактическое исследование) $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29b	5 мг/кг вводили в дни 1 и 4	Тамоксифен	День 1, затем 2 раза в неделю в течение первой недели и 3 раза в неделю, начиная с недели 2
5	(Вмешательство) Физиологический раствор (без агента РНКи) для первых двух доз с последующим введением $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29b	Физиологический раствор (без агента РНКи) вводили в дни 3 и 5 5 мг/кг агента РНКи вводили в дни 10 и 12	Тамоксифен	День 1, затем 2 раза в неделю в течение первой недели и 3 раза в неделю, начиная с недели 2

Каждой мыши вводили контрольный препарат кукурузного масла или раствор тамоксифена (1 мг/мл) через пероральный желудочный зонд в объеме дозы 100 мкл на 20 г веса тела (5 мг/кг) дважды в неделю в течение недели 1 и три раза в неделю с недели 2 по неделю 4.

Агент РНКи в примере 10 (группы 2 и 4-6) синтезировали с включенными нуклеотидными последовательностями, направленными на ген *DUX4*, и он включал функционализованную реакционноспособную аминогруппу (NH₂-C6) на 5'-конце смысловой цепи для ускорения конъюгирования с соответствующим направляющим лигандом или линкером. Пептид 1 конъюгировали со смысловой цепью агента РНКи DUX4. Пептид 1 являлся связанным с агентом РНКи, функционализированным (NH₂-C6), с использованием реакции конденсации амида на 5'-конце смысловой цепи (см. информацию о структуре в примере 6).

Агенты РНКи DUX4 в примере 6 дополнительно синтезировали с дисульфидной функциональной группой (C6-SS-C6) на 3'-конце смысловой цепи для ускорения конъюгирования с модулятором ФК/ФД. Фрагмент LP29b являлся присоединенным к 3'-концу смысловой нити, и использовался в качестве

5 фармакокинетического/фармакодинамического (ФК/ФД) модулятора, имеющего следующую структуру:



где R содержит агент РНКи DUX4.

10 Малеймид LP29-р являлся связанным с 3'-концом смысловой цепи с использованием восстановления терминальной 3'-дисульфидной связи и проведения присоединения по Михаэлю к терминальному 3'-тиолу с целью синтеза агента РНКи.

15 Нуклеотидные последовательности модифицированного агента РНКи синтезировали, как указано в данном контексте в таблице 3, таблице 4.1, таблице 4.6, а также таблице 5.1, таблице 5.2, таблице 5.3 и таблице 5.4 (показаны полностью модифицированные конъюгаты).

Шести мышам вводили дозы в группе 1 (n=6), десяти мышам вводили дозы в группе 2 (n=10) и восьми мышам вводили дозы в каждой из групп 3-5 (n=8).

20 На день 26 животных умерщвляли, а мышцы собирали, обрабатывали и анализировали в соответствии с процедурами, описанными в примере 2. Средняя относительная экспрессия *DUX4* в собранной ткани показана в следующих таблицах для икроножных и трехглавых мышц.

Таблица 30.1

25 Средняя относительная экспрессия *DUX4* в икроножных мышцах мышей из примера 10, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Икроножная мышца, день 26	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.213
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.520	0.268

	Икроножная мышца, день 26	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 3 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29), введение дозы в дни 1 и 4	0.868	0.223
Группа 4 (5 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29), введение дозы в дни 1 и 4	0.909	0.224
Группа 5 (5 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29), введение дозы в дни 10 и 12	1.059	0.201

Таблица 30.2

Средняя относительная экспрессия *DUX4* в трицепсах мышей из примера 10, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трицепс, день 26	
	Относительная экспрессия <i>DUX4</i>	Стандартное отклонение (+/-)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.419
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.216	0.353
Группа 3 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29), введение дозы в дни 1 и 4	0.755	0.198
Группа 4 (5 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29), введение дозы в дни 1 и 4	0.583	0.126
Группа 5 (5 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29), введение дозы в дни 10 и 12	1.009	0.217

5

Средние относительные уровни транскриптов мРНК *Wfdc3* в собранной ткани определяли аналогичным образом, как показано в следующих таблицах для различных икроножных и трехглавых мышц.

Таблица 31.1

10 Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в икроножных мышцах мышей из примера 10, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Икроножная мышца, день 26		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.238	0.312

	Икроножная мышца, день 26		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	3.562	0.399	0.450
Группа 3 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29), введение дозы в дни 1 и 4	1.187	0.399	0.600
Группа 4 (5 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29), введение дозы в дни 1 и 4	0.320	0.103	0.151
Группа 5 (5 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29), введение дозы в дни 10 и 12	0.459	0.281	0.725

Таблица 31.2

Средняя относительная экспрессия *Wfdc3* в трицепсах мышечной ткани из примера 10, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трицепс, день 26		
	Относительная экспрессия <i>Wfdc3</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.453	0.828
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	2.726	0.938	1.429
Группа 3 (1 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29), введение дозы в дни 1 и 4	0.699	0.281	0.469
Группа 4 (5 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29), введение дозы в дни 1 и 4	0.075	0.027	0.043
Группа 5 (5 мг/кг $\alpha\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29), введение дозы в дни 10 и 12	0.147	0.110	0.430

5

Средние относительные уровни транскриптов мРНК *Myo1g* в собранной ткани определяли аналогичным образом, как показано в следующих таблицах для различных икроножных и трехглавых мышц.

Таблица 32.1

Средняя относительная экспрессия *Myo1g* в икроножных мышцах мышей из примера 10, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Икроножная мышца, день 26		
	Относительная экспрессия <i>Myo1g</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.079	0.086
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.685	0.163	0.180
Группа 3 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29), введение дозы в дни 1 и 4	0.977	0.337	0.515
Группа 4 (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29), введение дозы в дни 1 и 4	0.284	0.117	0.198
Группа 5 (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29), введение дозы в дни 10 и 12	0.392	0.166	0.288

5 Таблица 32.2

Средняя относительная экспрессия *Myo1g* в трицепсе мышей из примера 10, нормализованная к исходному уровню (группа 1).

	Трицепс, день 26		
	Относительная экспрессия <i>Myo1g</i>	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (Исходный уровень)	1.000	0.249	0.332
Группа 2 (Положительный контроль (только Тамоксифен))	1.375	0.275	0.343
Группа 3 (1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29), введение дозы в дни 1 и 4	0.701	0.293	0.504
Группа 4 (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29), введение дозы в дни 1 и 4	0.160	0.079	0.156
Группа 5 (5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ пептид 1-AD07778-LP29), введение дозы в дни 10 и 12	0.293	0.175	0.432

Мышей в примере 10 дополнительно подвергали воздействию аппарата Rotarod для проведения оценки крупной моторной координации, как описано выше в примере 2. Как показано на фиг. 12, на протяжении всего исследования

животные, которым вводили агенты РНКи DUX4 (группы 3-5), проявляли способность поддерживать равновесие и общую двигательную функцию на аппарате Rotarod, демонстрируя больше сходства с группой, получавшей отрицательный контроль с физиологическим раствором, когда тамоксифен не вводили (группа 1). Напротив, животные, получавшие тамоксифен, но не получавшие агент РНКи DUX4 (группа 2), были неспособны поддерживать равновесие и двигательную функцию в течение длительного времени и начинали падать с аппарата Rotarod намного раньше - ко дню 11 (по сравнению с группами 1, 3 и 4), что указывает на потерю мышечной функции у животных группы 2. Животные, которым вводили тамоксифен, но не вводили агент РНКи DUX4 до дня 10 (группа 5), аналогичным образом не сохраняли равновесие и двигательную функцию в течение длительного времени и начинали быстрее падать с аппарата Rotarod ко дню 11, однако после введения дозы агента РНКи DUX4 (начало дня 10) ко дню 15 эти животные поддерживали равновесие и двигательную функцию, достаточные для того, чтобы оставаться на аппарате Rotarod в течение времени, сравнимого с животными из групп 1, 3 и 4, что указывает на первоначальную потерю мышечной функции у животных группы 5, которая была устранена введением агента РНКи DUX4.

Как свидетельствуют приведенные выше данные, агент РНКи DUX4 продемонстрировал существенное ингибирование экспрессии гена *DUX4* и сохранение общей двигательной функции или обратимую потерю общей двигательной функции (как показано в группе 5, начиная приблизительно с дня 15) у модельных мышей.

Пример 11

Агенты *in vitro* ингибирования РНКи DUX4 в миотрубках, полученных от пациентов.

Замороженные нетрансформированные миобласты, полученные от пациентов с FSHD, получали из репозитория генетических клеток человека NIGMS в Институте медицинских исследований Кориелла (Камден, Нью-Джерси). Было показано, что после дифференцировки в мышечные трубки *in vitro* эти клетки экспрессируют относительно высокие уровни *DUX4* и генов-мишеней белка *DUX4*. Затем миобласты, полученные от пациентов с FSHD, были размножены и дифференцированы в миотрубочки *in vitro*.

Цель этого исследования состояла в том, чтобы оценить дозозависимую реакцию агента РНКи DUX4 на нокдаун экспрессии мРНК DUX4 и снижение уровня биомаркеров активности белка *DUX4* в миотрубочках, полученных от пациентов с FSHD после трансфекции.

5 Миобласты, полученные от пациентов с FSHD, были размножены и дифференцированы в миотрубочки *in vitro*. Агент РНКи DUX4 трансфицировали в дифференцирующиеся миотрубочки с использованием выпускаемого фирмой доступного реагента для трансфекции липофектамина (RNAiMAX, фирмы Thermo). Культуры миотрубочек собирали после того, как наблюдали
10 морфологию зрелых миотрубочек и исследовали относительную экспрессию генов-мишеней *DUX4* и DUX4.

Агент РНКи DUX4, тестируемый в миотрубочках, полученных от пациентов, представлял собой агент РНКи DUX4 AD07778, связанный с направляющим лигандом пептида 1 и модулятором ФК/ФД LP29b (см. AC000448
15 в таблице 5.4 для полностью модифицированной и конъюгированной структуры смысловой и антисмысловой цепи), который синтезировали по фосфорамидитной технологии на твердой фазе в соответствии с общими процедурами, известными в данной области техники и обычно используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как указано в примере 1 в данном контексте.

20 Агент РНКи DUX4 тестировали в концентрациях 1,0, 10 и 100 нМ. Также оценивали результаты «зашифрованного контроля», который включал те же направляющие лиганды и модификатор ФК/ФД, что и агент РНКи DUX4 AD07778, связанный с направляющим лигандом пептида 1, и модулятором ФК/ФД LP29b, однако «зашифрованный контроль» был модифицирован таким
25 образом, что предполагалось, что он станет не активным и не будет ингибировать экспрессию гена DUX4.

На фиг. 11 показано дозозависимое ингибирование миотрубочек, полученных от пациентов, с помощью агента РНКи DUX4, что позволяет предположить, что использование агента РНКи DUX4 эффективно для
30 снижения экспрессии белка *DUX4* путем подавления мРНК DUX4 в мышечных клетках человека. Данные были нормализованы по отношению к «зашифрованному контролю».

Кроме того, оценивали некоторые биомаркеры экспрессии DUX4, чтобы определить, как на них влияет агент РНКи DUX4. К ним относятся CCNA1,

KHDC1L, LEUTX, MDB3L2, PRAMEF2, PRAMEF6, SLC2A3, SLC34A2, TRIM43 и ZSCAN4. Эти гены являются известными генами-мишенями фактора транскрипции DUX4, повышенная экспрессия которых охарактеризована в биоптатах мышц пациентов с FSHD как маркеров повышенной экспрессии DUX4. Как показано на фиг. 12, клетки, в которые вводили агент РНКи DUX4, также демонстрировали снижение уровней экспрессии этих генов - биомаркеров FSHD.

Другие варианты осуществления изобретения

Следует понимать, что хотя настоящее изобретение было описано вместе с его подробным описанием в данном контексте, вышеизложенное описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие объекты, преимущества и модификации входят в объем следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Агент РНКи для ингибирования экспрессии гена двойного гомеобокса 4 (*DUX4*), содержащий:

5 i. антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, отличающихся на 0 или 1 нуклеотид от любой из последовательностей, приведенных в таблице 2, таблице 3 или таблице 5.4; и
10 ii. смысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере частично является комплементарной антисмысловой цепи.

2. Агент РНКи по п. 1, где антисмысловая цепь содержит 2-18 нуклеотидов любой из последовательностей, представленных в таблице 2, таблице 3 или таблице 5.4.

15 3. Агент РНКи по пунктам 1 или 2, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, состоящую по меньшей мере из 17 последовательных нуклеотидов, отличающихся на 0 или 1 нуклеотид от любой из последовательностей, указанных в таблице 2, таблице 4.1, таблице 4.2, 20 таблице 4.3, таблице 4.4, таблице 4.5, таблице 4.6 или таблице 5.4, и где смысловая цепь характеризуется областью, которая является комплементарной по меньшей мере на 85% на протяжении 17 последовательных нуклеотидов к антисмысловой цепи.

25 4. Агент РНКи по любому из пунктов 1-3, где по меньшей мере один нуклеотид агента РНКи *DUX4* представляет собой модифицированный нуклеотид или включает модифицированную межнуклеозидную связь.

30 5. Агент РНКи по любому из пунктов 1-3, в котором все или в основном все нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами.

6. Агент РНКи по любому из пунктов 4-5, где модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из: 2'-О-метилнуклеотида, 2'-фторнуклеотида, 2'-дезоксинуклеотида, 2',3'-секонуклеотидного миметика,

замкнутого нуклеотида, 2'-F-арабинонуклеотида, 2'-метоксиэтилнуклеотида, нуклеотида, лишенного азотистого основания, рибитола, инвертированного нуклеотида, инвертированного 2'-О-метилнуклеотида, инвертированного 2'-дезоксинуклеотида, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-
5 модифицированного нуклеотида, морфолинонуклеотида, винилфосфонатсодержащего нуклеотида, циклопропилфосфонатсодержащего нуклеотида и 3'О-метилнуклеотида.

10 7. Агент РНКи по п.5, где все или в основном все модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метилнуклеотиды, 2'-фторнуклеотиды или их комбинации.

15 8. Агент РНКи по любому из пунктов 1-7, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность любой из модифицированных последовательностей, представленных в таблице 3.

20 9. Агент РНКи по любому из пунктов 1-8, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность любой из модифицированных последовательностей, представленных в таблице 4.1, таблице 4.2, таблице 4.3, таблице 4.4, таблице 4.5, таблице 4.6 или таблице 5.4.

25 10. Агент РНКи по п.1, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность любой из модифицированных последовательностей, представленных в таблице 3, а смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность любой из модифицированных последовательностей, представленных в таблице 4.1, таблице 4.2, таблице 4.3, таблице 4.4, таблице 4.5, таблице 4.6 или таблице 5.4.

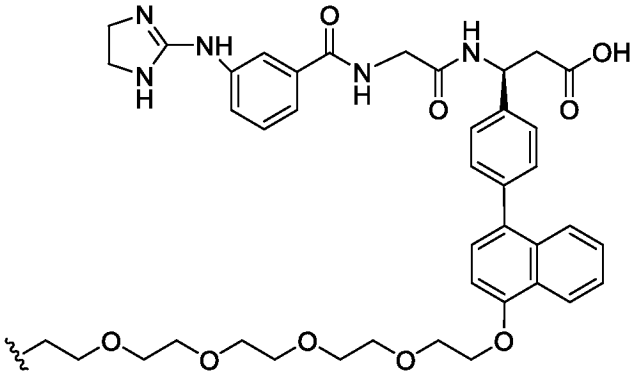
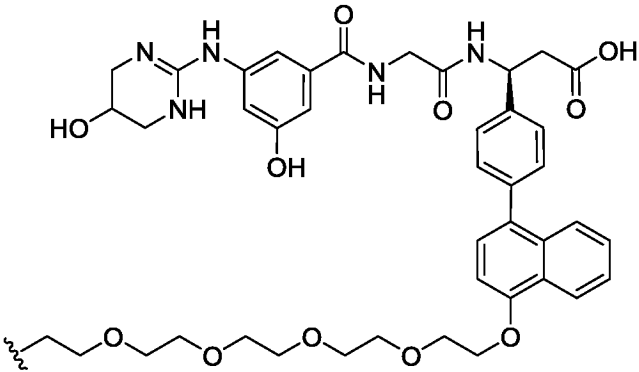
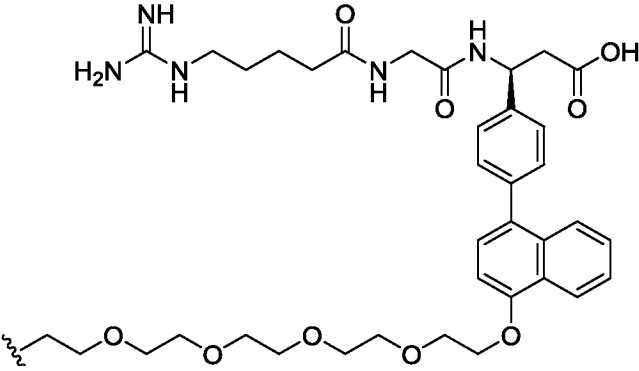
30 11. Агент РНКи по любому из пунктов 1-10, где агент РНКи привоединен к направляющему лиганду.

12. Агент РНКи по п.11, где направляющий лиганд присоединен к смысловой цепи.

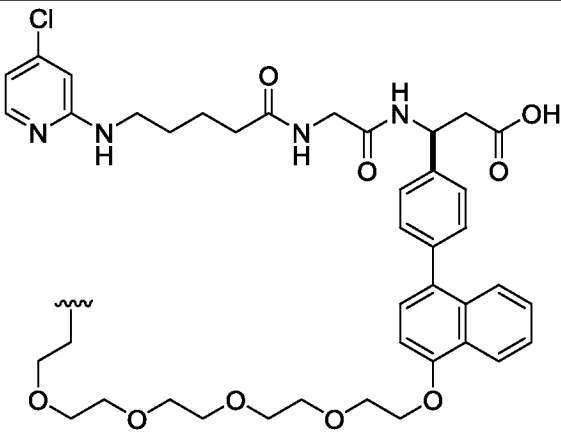
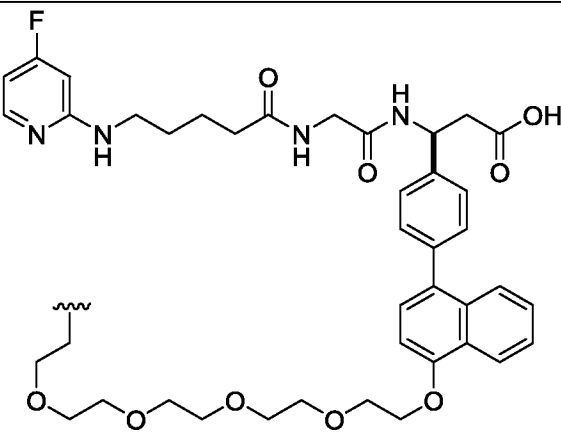
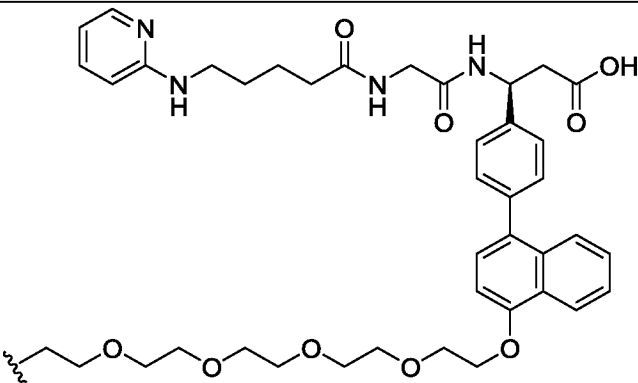
13. Агент РНКи по п.12, где направляющий лиганд присоединен к 5'-концу смысловой цепи.

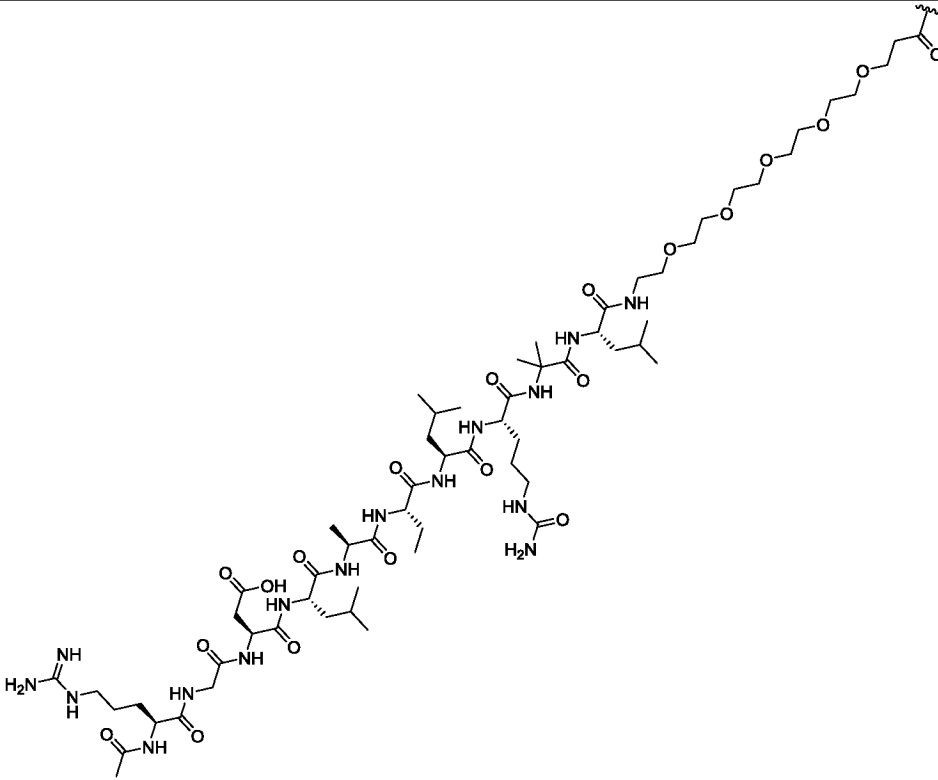
14. Агент РНКи по любому из пунктов 11-13, где направляющий лиганд обладает сродством к клетке скелетных мышц и/или клеточному рецептору, экспрессированному на клетке скелетных мышц.

15. Агент РНКи по любому из пунктов 11-14, где направляющий лиганд выбран из группы, состоящей из следующих элементов:

Номер соединения	Формула
40b	
41b	
42b	

Номер соединения	Формула
54b	
55b	
56b	
57b	

Номер соединения	Формула
58b	
59b	
60b	

Номер соединения	Формула
$\alpha\nu\beta 6$ пептид 1	

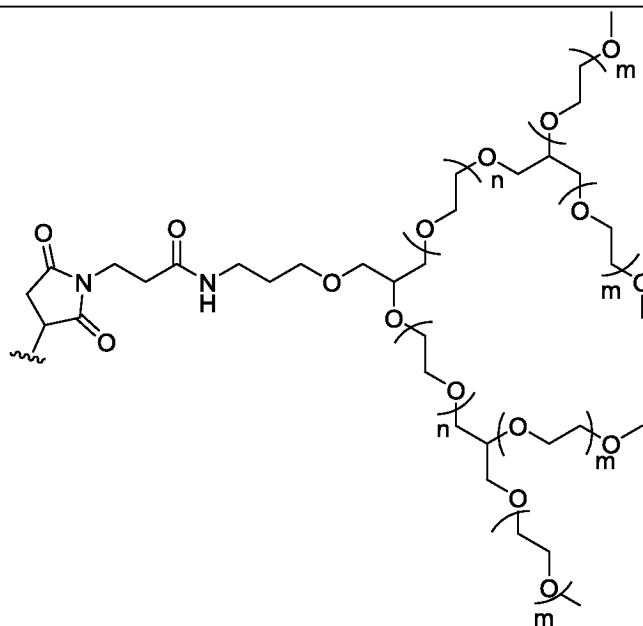
или фармацевтически приемлемой соли этих соединений, где элемент  указывает на место присоединения к агенту РНКи.

5 16. Агент РНКи по любому из пунктов 1-15, где агент РНКи дополнительно связан с фармакокинетическим/фармакодинамическим (ФК/ФД) модулятором.

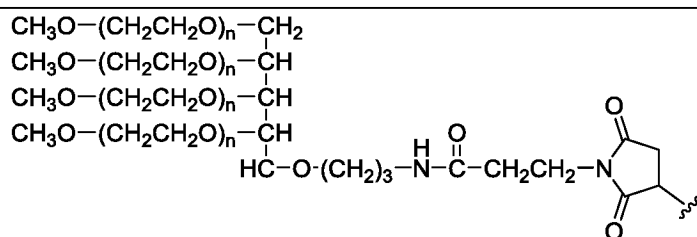
17. Агент РНКи по п.16, где модулятор ФК/ФД связан со смысловой цепью.

10 18. Агент РНКи по п.17, где модулятор ФК/ФД связан с 3'-концом смысловой цепи.

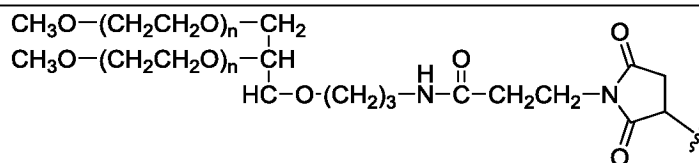
19. Агент РНКи по любому из пунктов 16-18, где модулятор ФК/ФД выбран из группы, состоящей из следующих элементов:



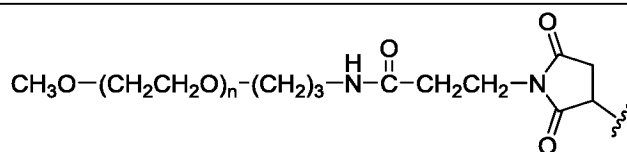
ПЭГ40К (2х цепь с двумя разветвлениями),
где n и m представляют собой целые числа, а молекулярная масса звеньев ПЭГ
составляет приблизительно 40 кДа



ПЭГ40К (цепь с четырьмя разветвлениями),
где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ
составляет приблизительно 40 кДа

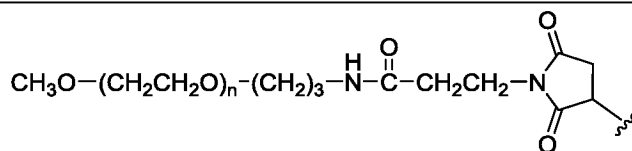


ПЭГ40К (цепь с двумя разветвлениями),
где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ
составляет приблизительно 40 кДа



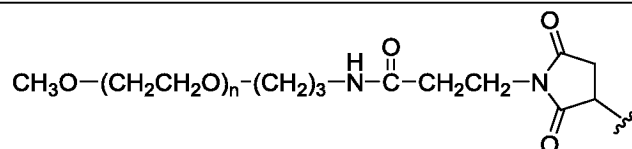
ПЭГ40К,

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 40 кДа



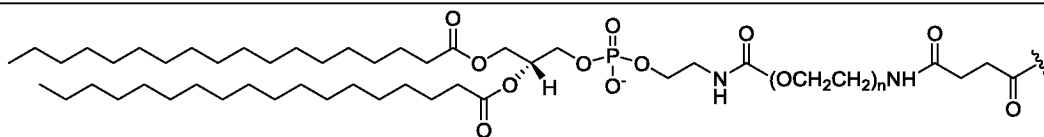
ПЭГ10К,

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 10 кДа



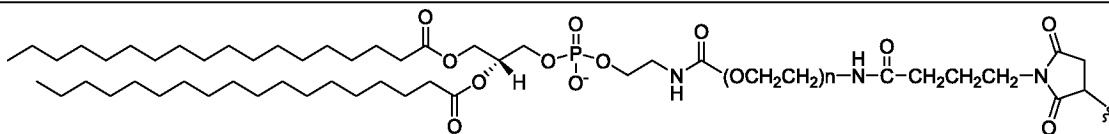
ПЭГ5К,

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 5 кДа



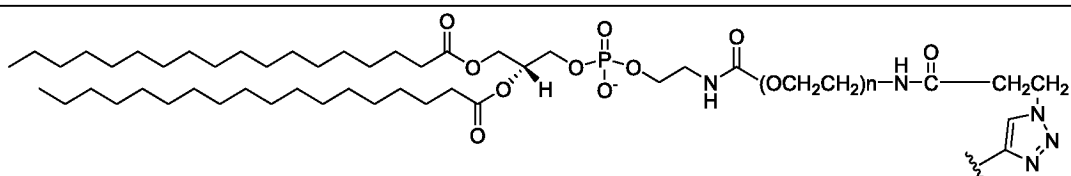
DSPE-ΠΕΓ5K-NHS

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 5 кДа



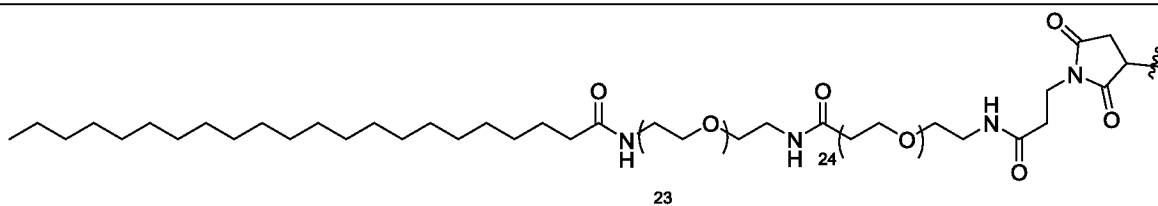
DSPE-ПЭГ5K-MAL

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 5 кДа

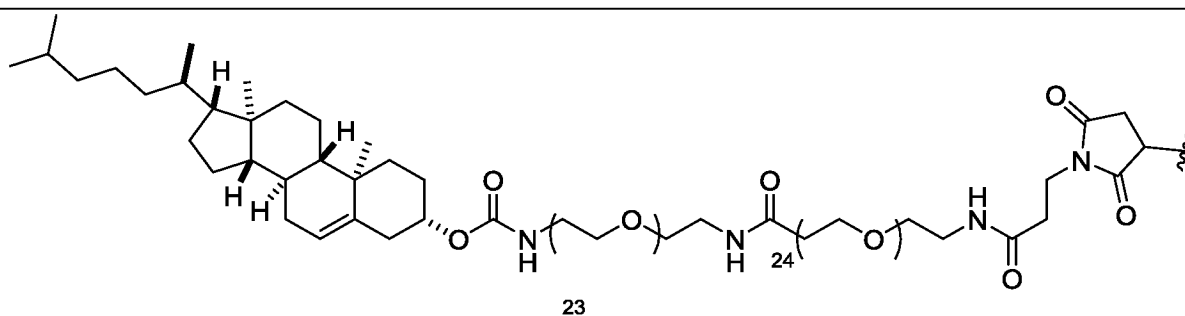


DSPE-ПЭГ5K-N3

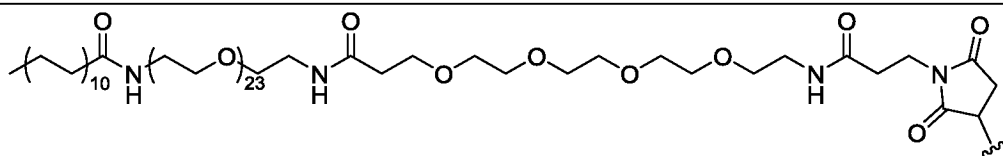
где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 5 кДа



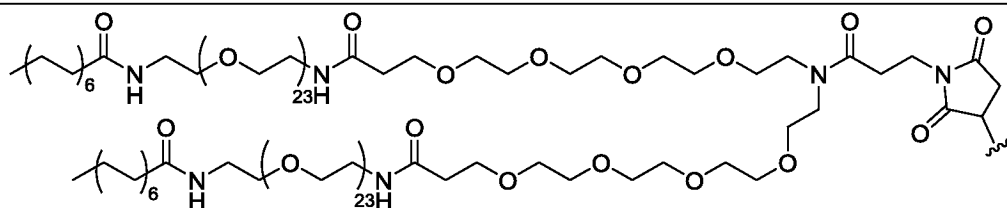
ПЭГ47+C22



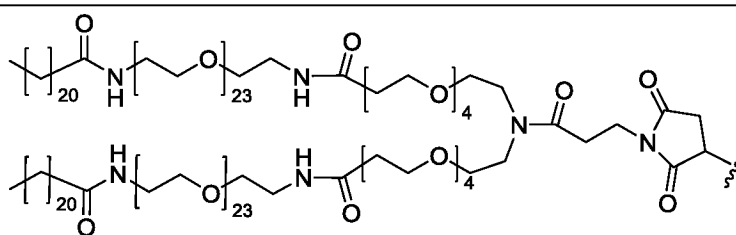
ПЭГ47+CLS (холестерин)



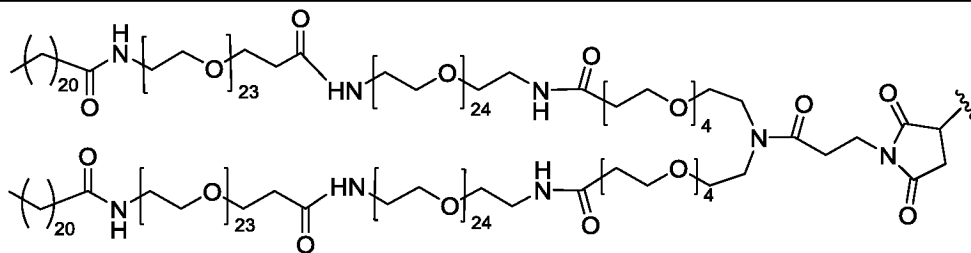
ПЭГ23+C22



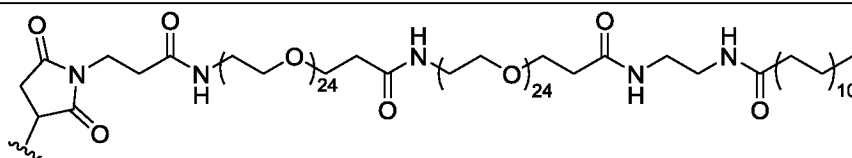
Бис(ПЭГ23+C14)



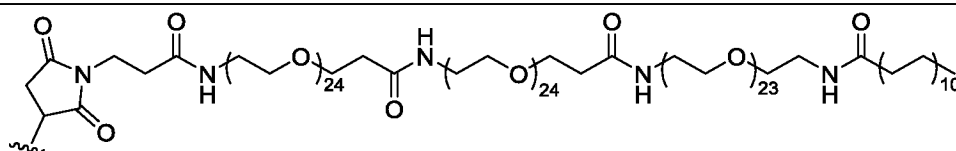
Бис(ПЭГ23+C22)



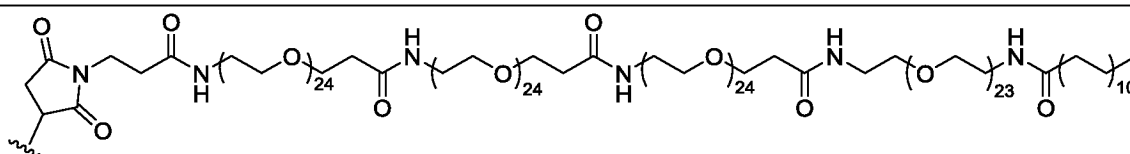
Бис(ПЭГ47+С22)



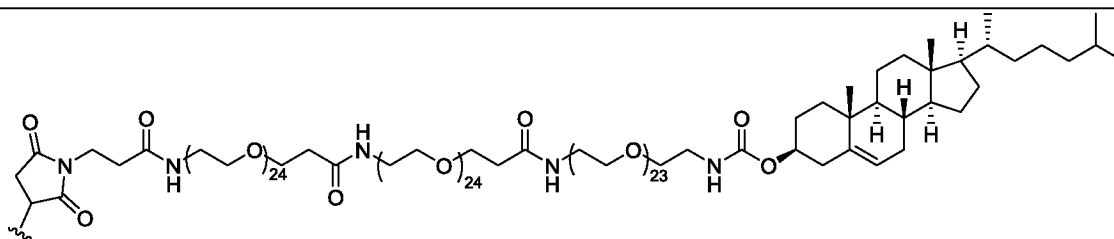
ПЭГ48+С22



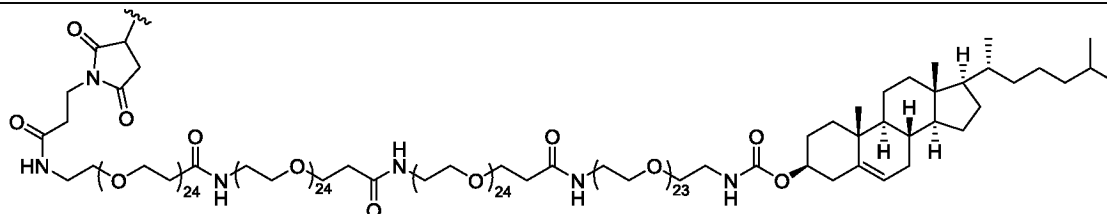
ПЭГ71+С22



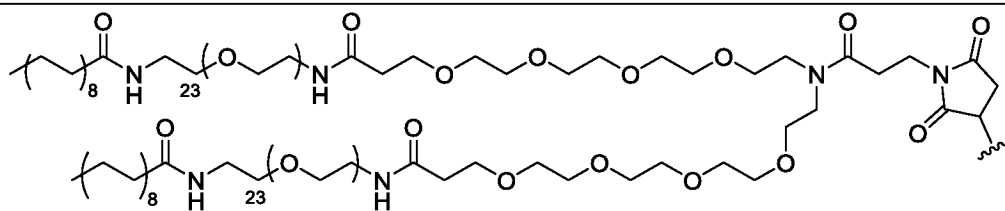
ПЭГ95+С22



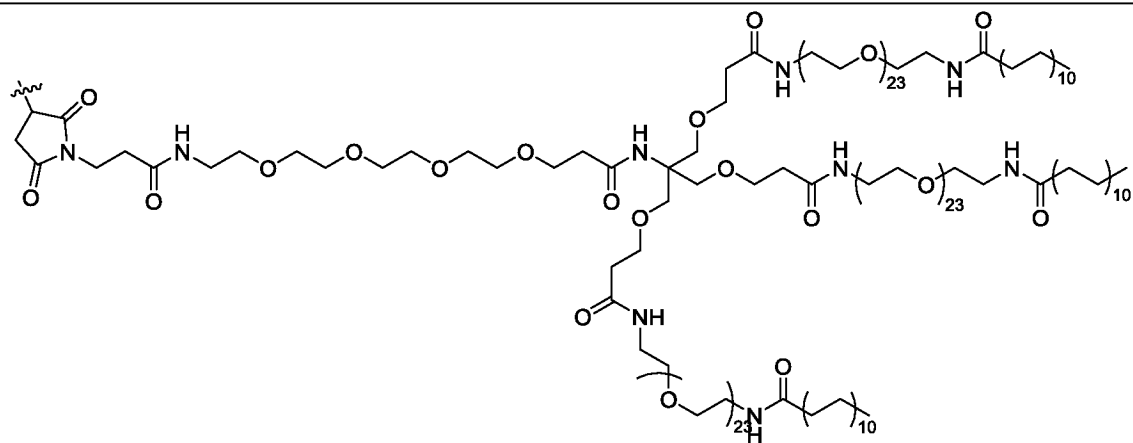
ПЭГ71+СLS



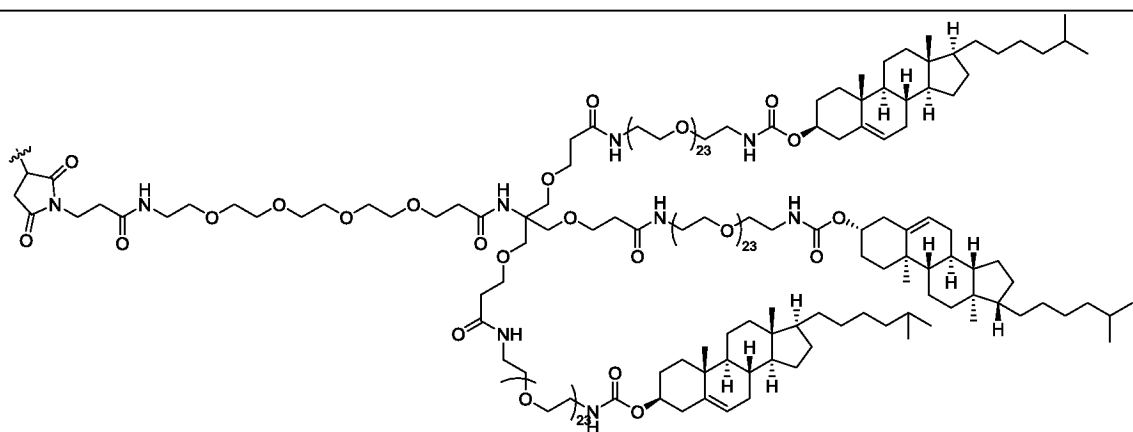
ПЭГ95+СLS



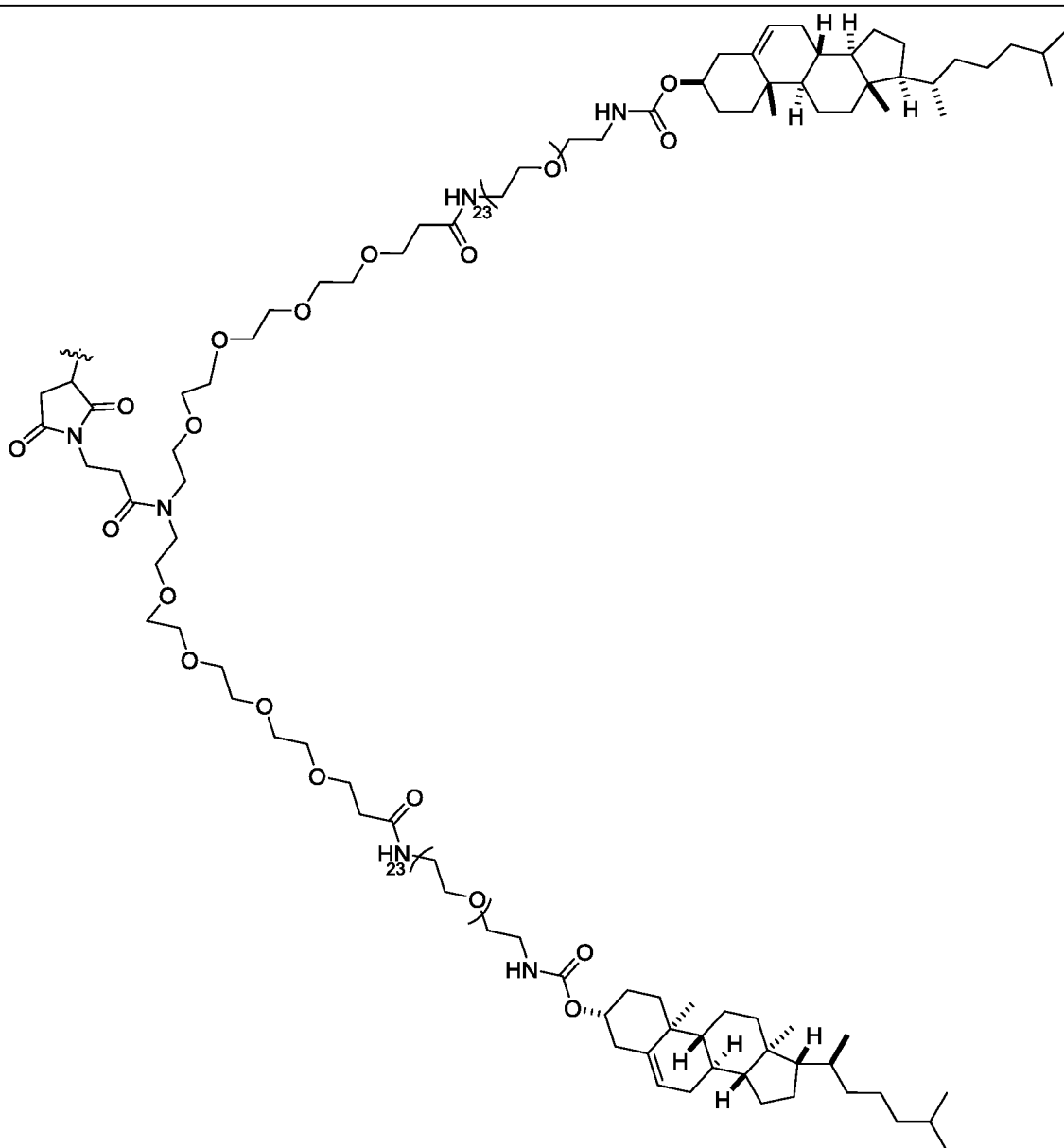
Бис(ПЭГ23+С18)



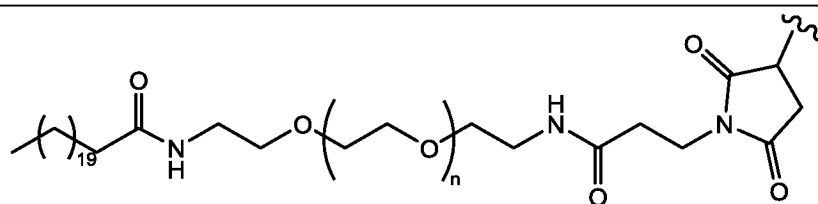
Трис(ПЭГ23+С22)



Трис(ПЭГ23+СLS)

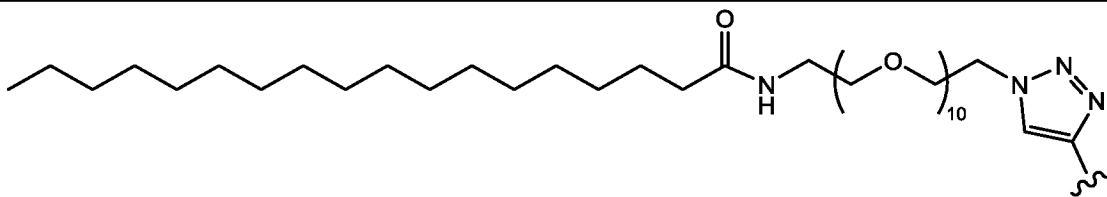


Бис(ПЭГ23+CLS)

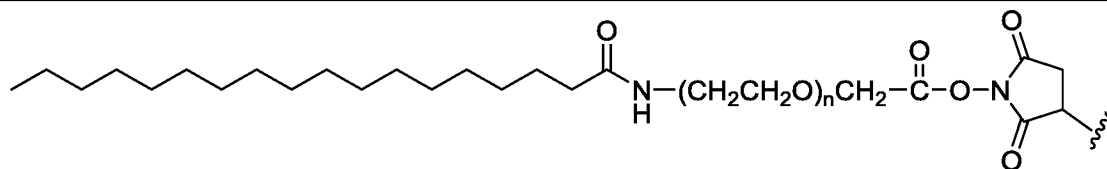


ПЭГ5K+C22

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 5 кДа

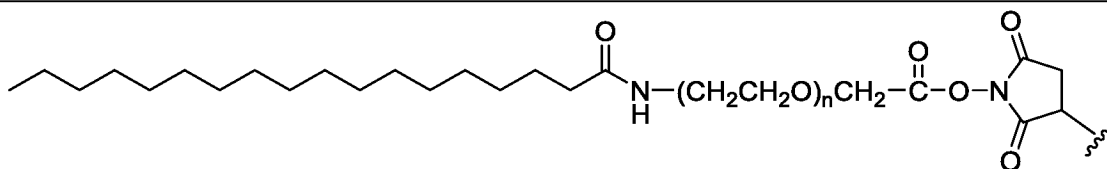


C18



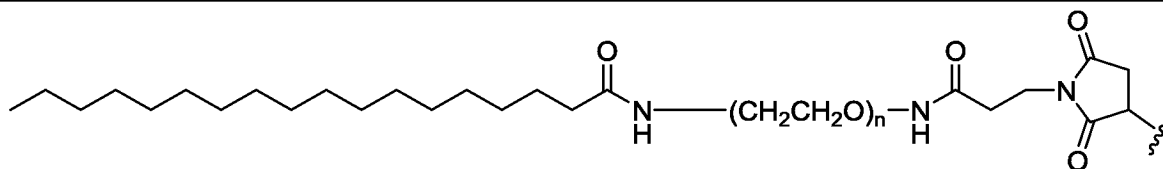
(NHS)-ПЭГ1К+С18

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 1 кДа



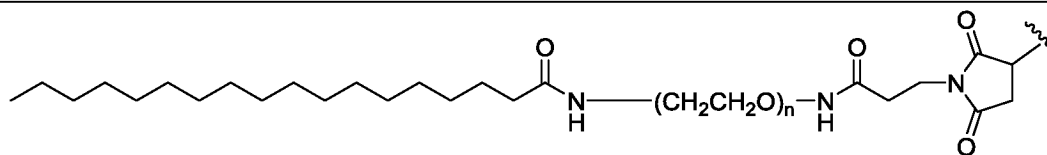
(NHS)-ПЭГ2К+С18

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 2 кДа



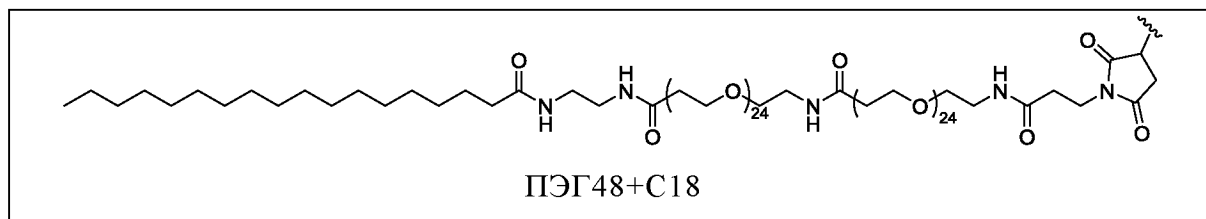
(NHS)-ПЭГ5К+С18

где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 5 кДа



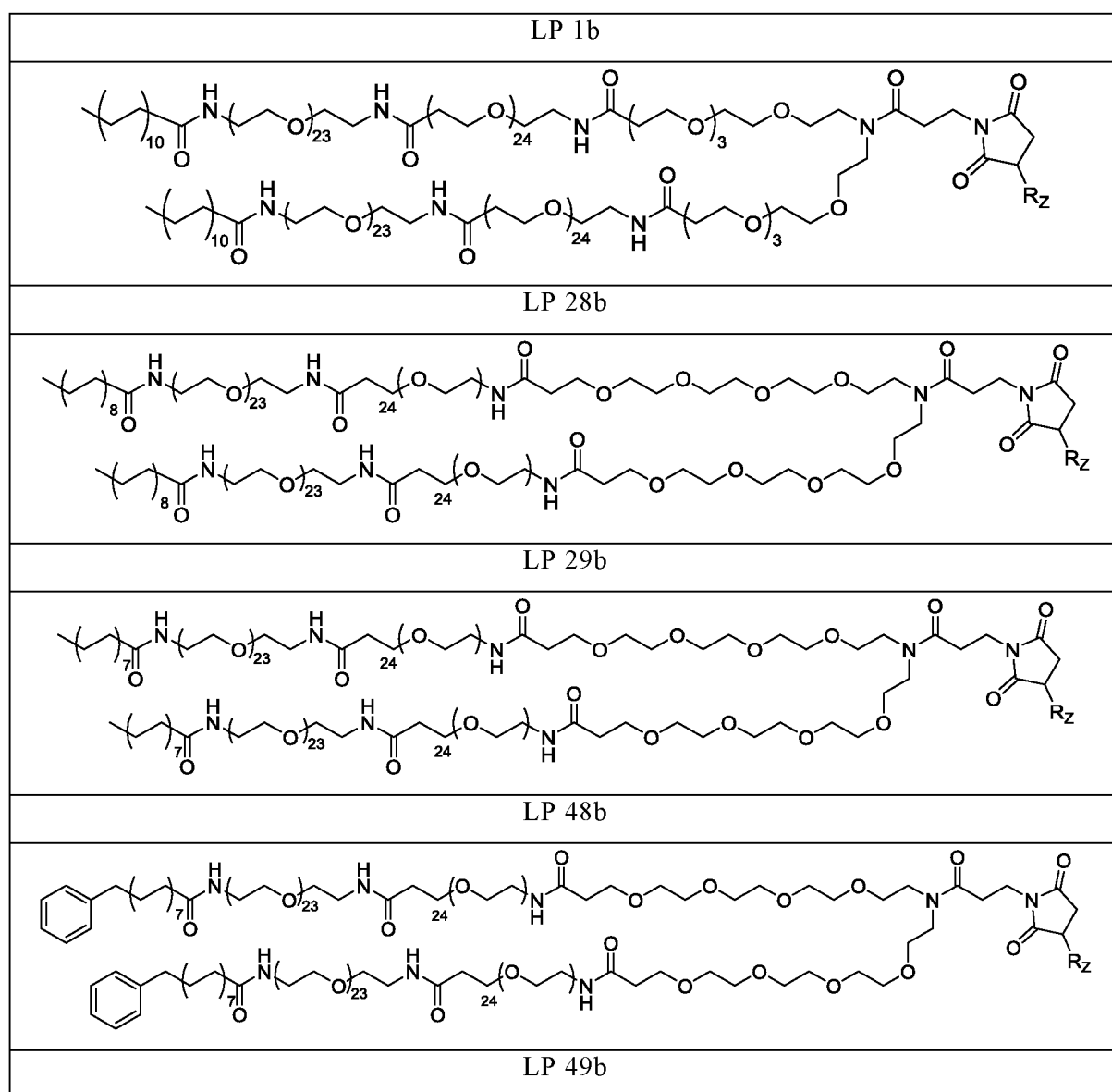
(MAL)-ПЭГ5К+С18

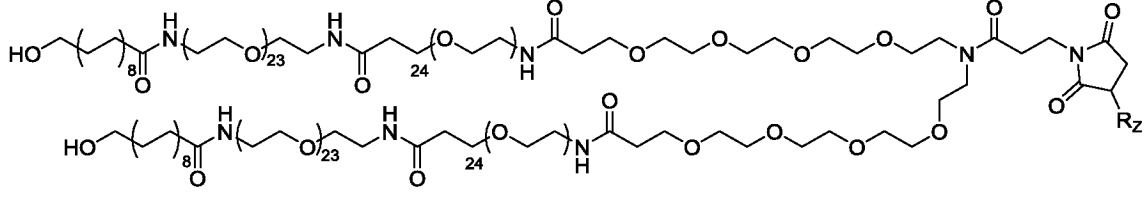
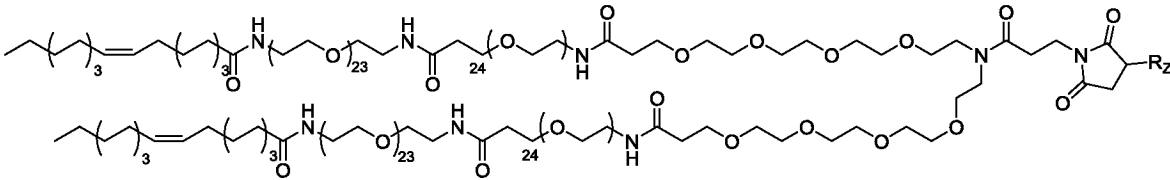
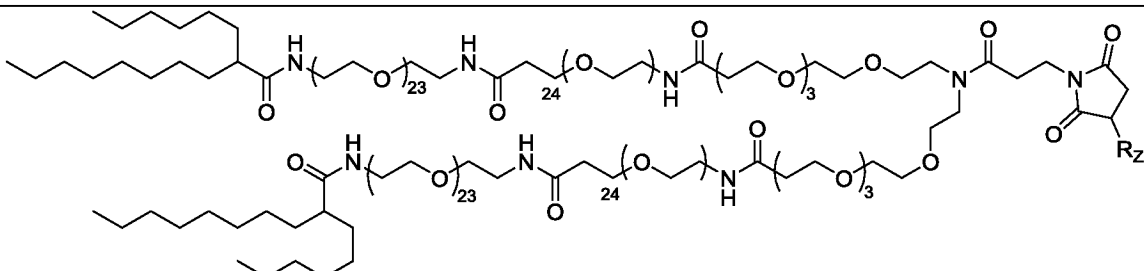
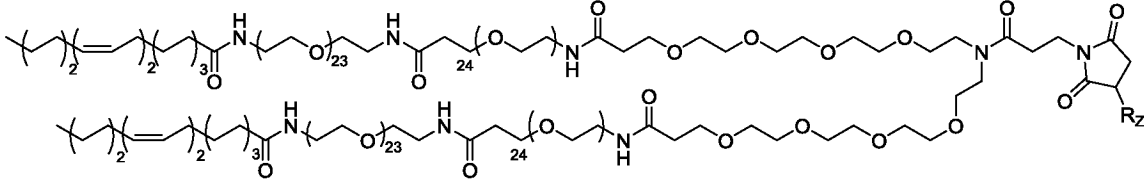
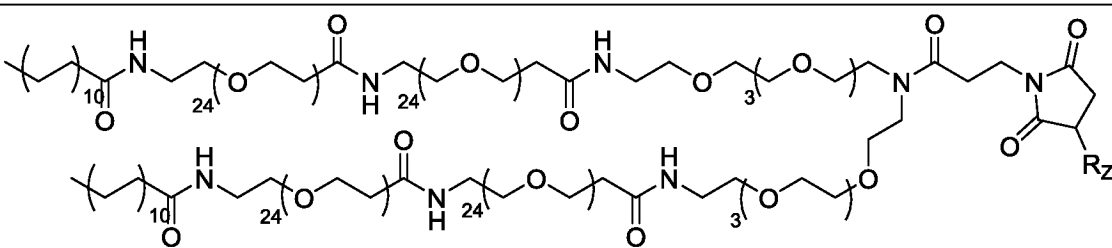
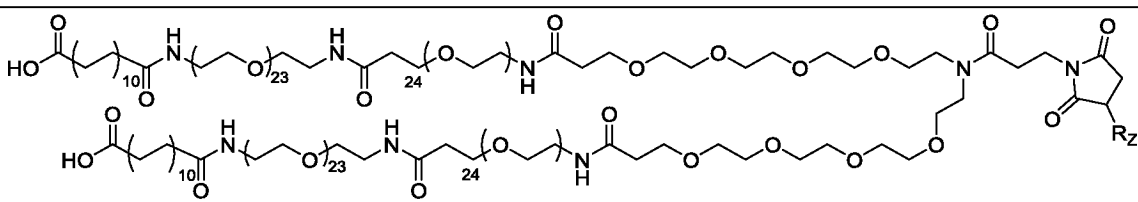
где n представляет собой целое число, а молекулярная масса звеньев ПЭГ составляет приблизительно 5 кДа



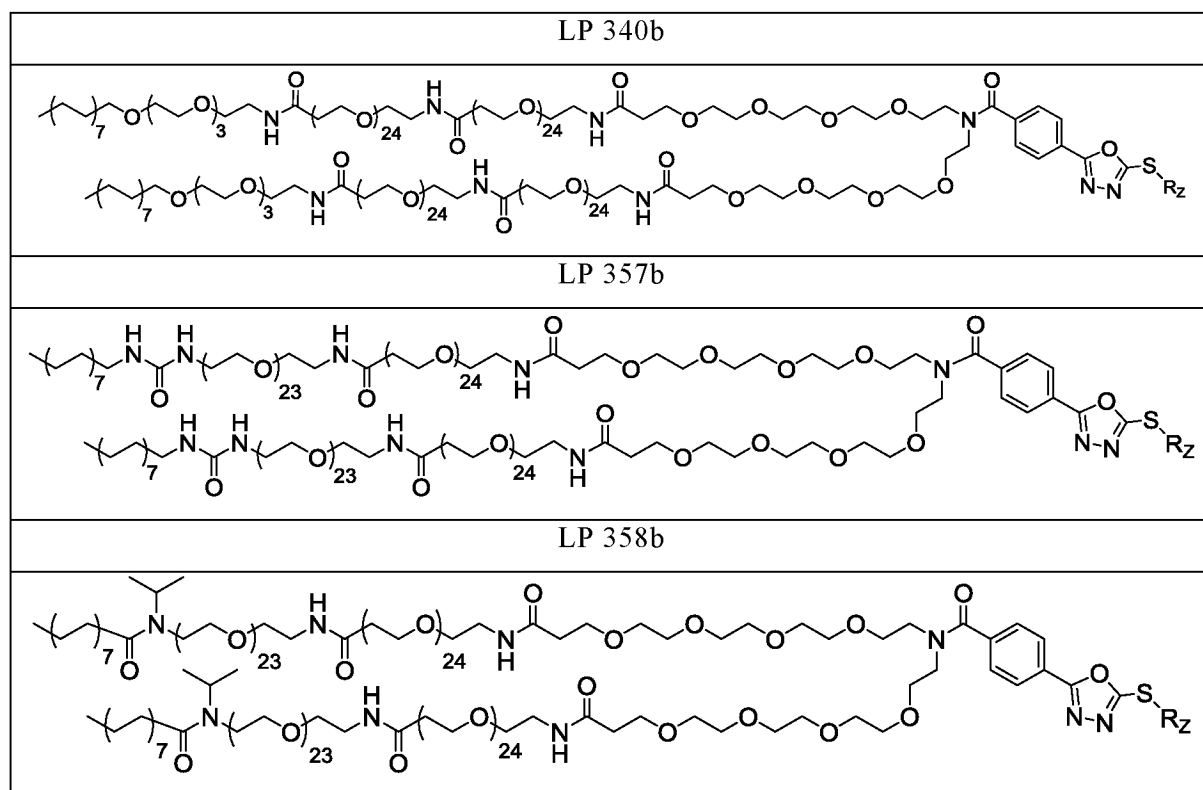
или их фармацевтически приемлемой соли, где элемент указывает на место присоединения к агенту РНКи.

20. Агент РНКи по любому из пунктов 17-19, где модулятор ФК/ФД выбран из группы, состоящей из следующих модуляторов:




LP 56b

LP 61b

LP 87b

LP 89b

LP 90b

LP 92b

LP 93b
LP 94b
LP 95b
LP 102b
LP 103b
LP 223b
LP 224b



где R_Z содержит агент РНКи.

21. Агент РНКи по любому из пунктов 1-20, где длина смысловой цепи составляет от 15 до 49 нуклеотидов, а длина антисмысловой цепи составляет от 17 до 30 нуклеотидов.

22. Агент РНКи по п.21, где длина смысловой цепи и антисмысловой цепи составляет от 18 до 24 нуклеотидов каждая.

23. Агент РНКи по п.22, где длина смысловой цепи и антисмысловой цепи составляет 21 нуклеотид каждая.

24. Агент РНКи по п.23, агент РНКи содержит два тупых конца.

25. Агент РНКи по любому из пунктов 1-24, где смысловая цепь содержит один или два концевых кэпа.

26. Агент РНК-интерференции по любому из пунктов 1-25, где смысловая цепь содержит один или два инвертированных остатка дезоксирибозы, лишенных азотистого основания.

5 27. Агент РНКи по любому из пунктов 1-26, содержащий антисмысловую цепь, которая состоит, в основном состоит из или содержит нуклеотидную последовательность, которая отличается на 0 или 1 нуклеотид от одной из следующих нуклеотидных последовательностей (5' → 3'):

10 UAGAAUUUCACGGAAGAAC (SEQ ID NO:22),
 UGAAACCAGAUUCUGAAUCC (SEQ ID NO:10),
 UUGAAACCAGAUUCUGAUC (SEQ ID NO:14),
 UAGAAUUUCACGGAAGAACAG (SEQ ID NO:164),
 UGAAACCAGAUUCUGAAUCCUG (SEQ ID NO:162),
 UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCU (SEQ ID NO:163), и
 15 UUGAAACCAGAUUCUGAAUCCC (SEQ ID NO:169).

28. Агент РНКи по п.27, где все или в основном все нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами.

20 29. Агент РНКи по любому из пунктов 1-28, содержащий антисмысловую цепь, которая содержит, состоит из или в основном состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности, которая отличается на 0 или 1 нуклеотид от одной из следующих нуклеотидных последовательностей (5' → 3'):

25 usAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:82),
 cPrpusAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:84),
 cPrpusAfsGfsAfauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:100),
 cPrpusAfsGfsaauuucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:101),
 cPrpusGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:97),
 30 cPrpusGfsasAfaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:99),
 cPrpusGfsasAfaCfcAfgAfuCfuGfaAfuCfcUfsg (SEQ ID NO:75),
 usGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:96),
 cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsu (SEQ ID NO:76),
 cPrpusUfsgsaaccagaUfcUfgAfauccsc (SEQ ID NO:89) и

cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsc (SEQ ID NO:87),

где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин, 2'-О-метилцитидин, 2'-О-метилгуанозин и 2'-О-метилуридин соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, 2'-фторцитидин, 2'-фторгуанозин и 2'-фторуридин соответственно; сPrpu представляет собой 5'-циклопропилфосфонат-2'-О-метилуридин; s представляет собой фосфоротиоатную связь, и при этом все или в основном все нуклеотиды смысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды.

30. Агент РНКи по п. 29, где смысловая цепь содержит, состоит из или в основном состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности, которая отличается на 0 или 1 нуклеотид от одной из следующих нуклеотидных последовательностей (5' → 3'):

caggauucAfGfAfucugguuuca (SEQ ID NO:147),

aggauucaGfAfUfcugguuucaa (SEQ ID NO:148),

cuguucuuCfCfGfugaaaauucua (SEQ ID NO:149),

gggauucaGfAfUfcugguuucaa (SEQ ID NO:156) и

gggauucaGfaUfCfugguuucaa (SEQ ID NO:159),

где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин, 2'-О-метилцитидин, 2'-О-метилгуанозин и 2'-О-метилуридин соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, 2'-фторцитидин, 2'-фторгуанозин и 2'-фторуридин соответственно, и при этом все или в основном все нуклеотиды на антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды.

31. Агент РНКи по любому из пунктов 1-30, включающий:

(i) антисмысловую цепь, которая состоит из, в основном состоит из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3')

usAfsGfsAfauiucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:82) и смысловую цепь, которая состоит из, в основном состоит из или содержит модифицированную

нуклеотидную последовательность (5' → 3') cuguucuuCfCfGfugaaaauucua (SEQ ID NO:149),

(ii) антисмысловую цепь, которая состоит из, в основном состоит из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3')

cPrpusAfsGfsAfauiucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:84) и смысловую цепь,

которая состоит из, состоит в основном из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') cuguucuuCfCfGfugaaaуucua (SEQ ID NO:149),

(iii) антисмысловую цепь, которая состоит из, в основном состоит из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') cPrpusAfsgsAfauуucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:100) и смысловую цепь, которая состоит из, состоит в основном из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') cuguucuuCfCfGfugaaaуucua (SEQ ID NO:149),

(iv) антисмысловую цепь, которая состоит из, в основном состоит из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') cPrpusAfsGfsaaуucacGfgAfaGfaacasg (SEQ ID NO:101) и смысловую цепь, которая состоит из, состоит в основном из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') cuguucuuCfCfGfugaaaуucua (SEQ ID NO:149),

(v) антисмысловую цепь, которая состоит из, в основном состоит из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') cPrpusGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:97) и смысловую цепь, которая состоит из, состоит в основном из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') caggauуcAfGfAfucuggуuуca (SEQ ID NO:147),

(vi) антисмысловую цепь, которая состоит из, в основном состоит из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') cPrpusGfsasAfaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:99) и смысловую цепь, которая состоит из, состоит в основном из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') caggauуcAfGfAfucuggуuуca (SEQ ID NO:147),

(vii) антисмысловую цепь, которая состоит из, в основном состоит из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') cPrpusGfsasAfaCfcAfgAfuCfuGfaAfuCfcUfsg (SEQ ID NO:75) и смысловую цепь, которая состоит из, состоит в основном из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') caggauуcAfGfAfucuggуuуca (SEQ ID NO:147),

(viii) антисмысловую цепь, которая состоит из, в основном состоит из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') usGfsasaaccagauCfuGfaAfuccusg (SEQ ID NO:96) и смысловую цепь, которая состоит из, состоит в основном из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') caggauucAfGfAfucugguuuca (SEQ ID NO:147),

(ix) антисмысловую цепь, которая состоит из, в основном состоит из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsu (SEQ ID NO:76) и смысловую цепь, которая состоит из, состоит в основном из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') aggauucaGfAfUfcugguuuca (SEQ ID NO:148),

(x) антисмысловую цепь, которая состоит из, в основном состоит из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') cPrpusUfsgsaaaccagaUfcUfgAfauccsc (SEQ ID NO:89) и смысловую цепь, которая состоит из, состоит в основном из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') gggauucaGfAfUfcugguuuca (SEQ ID NO:156) или

(xi) антисмысловую цепь, которая состоит из, в основном состоит из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') cPrpusUfsgsAfaAfcCfaGfaUfcUfgAfaUfcCfsc (SEQ ID NO:87) и смысловую цепь, которая состоит из, состоит в основном из или содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (5' → 3') gggauucaGfaUfCfugguuuca (SEQ ID NO:159),

где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин, 2'-О-метилцитидин, 2'-О-метилгуанозин и 2'-О-метилуридин соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, 2'-фторцитидин, 2'-фторгуанозин и 2'-фторуридин соответственно; cPrpu представляет собой 5'-циклопропилфосфонат-2'-О-метилуридин; s представляет собой фосфоротриатную связь, и при этом соответствующая смысловая цепь дополнительно необязательно включает инвертированный остаток, лишенный азотистого основания на 3'-конце нуклеотидной последовательности и на 5'-конце нуклеотидной последовательности, и смысловая цепь также необязательно включает направляющий лиганд, который является ковалентно связанным с

инвертированным остатком, лишенным азотистого основания на 5'-конце смысловой цепи, при этом направляющий лиганд обладает сродством к клеткам скелетных мышц и/или рецептору, присутствующему на клетках скелетных мышц, и при этом смысловая цепь дополнительно необязательно включает модулятор ФК/ФД, который является ковалентно связанным с инвертированным остатком, лишенным азотистого основания на 3'-конце смысловой цепи.

32. Агент РНКи по п.1, где агент РНКи состоит из смысловой цепи и антисмысловой цепи, которые образуют дуплекс, который характеризуется структурой любого из дуплексов, указанных в таблице 5.1, таблице 5.2, таблице 5.3 или таблице 5.4.

33. Агент РНКи по п.32, где смысловая цепь дополнительно включает инвертированные остатки дезоксирибозы с удаленным азотистым основанием на 3'-конце и/или на 5'-конце нуклеотидной последовательности.

34. Агент РНКи по п.33, где все или в основном все нуклеотиды представляют собой модифицированные нуклеотиды.

35. Агент РНКи по любому из пунктов 32-34, где смысловая цепь агента РНКи присоединена к направляющему лиганду.

36. Агент РНКи по п.35, где направляющий лиганд обладает сродством к клеточному рецептору, экспрессированному на клетке скелетных мышц.

37. Агент РНКи по любому из пунктов 35-36, где направляющий лиганд содержит соединение, характеризующееся структурой, указанной в таблице 6.2 или таблице 6.3.

38. Агент РНКи по любому из пунктов 1-37, где агент РНКи представляет собой фармацевтически приемлемую соль.

39. Агент РНКи по п.38, где агент РНКи присутствует в форме натриевой соли.

40. Фармацевтическая композиция, содержащая агент РНКи по любому из пунктов 1-39, где композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый эксципиент.

5

41. Способ ингибирования экспрессии гена *DUX4* в клетке, включающий введение в клетку эффективного количества агента РНКи по любому из пунктов 1-39 или композицию по п. 40.

10

42. Способ по п. 41, где клетка находится внутри субъекта.

43. Способ по п. 42, где субъектом является человек.

15

44. Способ по любому из пунктов 41-43, где экспрессия гена *DUX4* ингибируется по меньшей мере приблизительно на 40%.

45. Способ по любому из пунктов 41-44, где уровни белка *DUX4* снижаются по меньшей мере приблизительно на 40%.

20

46. Способ лечения одного или более симптомов или заболеваний, интенсивность которых можно снизить, по меньшей мере частично, за счет понижения уровней белка *DUX4*, понижения уровней мРНК *DUX4*, причем способ включает введение субъекту-человеку, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 40.

25

47. Способ по п. 46, где заболевание представляет собой FSHD.

30

48. Способ по любому из пунктов 41-47, где экспрессия гена *DUX4* снижена в одной или более параспинальных, лицевых, туловищных, брюшных и конечностных мышечных тканях субъекта.

49. Способ по любому из пунктов 41-48, где экспрессия гена *DUX4* снижена в одной или более трехглавых, двухглавых, четырехглавых,

икроножных, камбаловидных мышцах, EDL (длинный разгибатель пальцев), ТА (передняя большеберцовая мышца) или диафрагме субъекта.

50. Способ по любому из пунктов 41-49, где агент РНКи вводят в дозе от
5 приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 10,0 мг/кг массы тела.

51. Способ по п. 50, где агент РНКи вводят с помощью подкожной (п/к) инъекции.

10 52. Применение агента РНКи по любому из пунктов 1-39 или композиции по п. 40 для лечения заболевания, расстройства или симптома, которые по меньшей мере частично опосредованы снижением уровней белка DUX4 или снижением уровней мРНК DUX4 или обоих уровней.

15 53. Применение композиции по п.40 для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания, расстройства или симптома, которые по меньшей мере частично опосредованы снижением уровней белка DUX4 или снижением уровней мРНК DUX4, или обоих уровней.

20 54. Композиция для ингибирования экспрессии гена двойного гомеобокса 4 (*DUX4*), содержащая:

i. агент РНКи, содержащий антисмысловую цепь длиной от 18 до 49 нуклеотидов, которая по меньшей мере частично комплементарна части последовательности SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2,

25 ii. направляющий лиганд, присоединенный к агенту РНКи, причем направляющий лиганд обладает сродством к клеткам скелетных мышц, и

iii. модулятор ФК/ФД, присоединенный к агенту РНКи.

30 55. Агент РНКи для ингибирования экспрессии гена двойного гомеобокса 4 (*DUX4*), включающий:

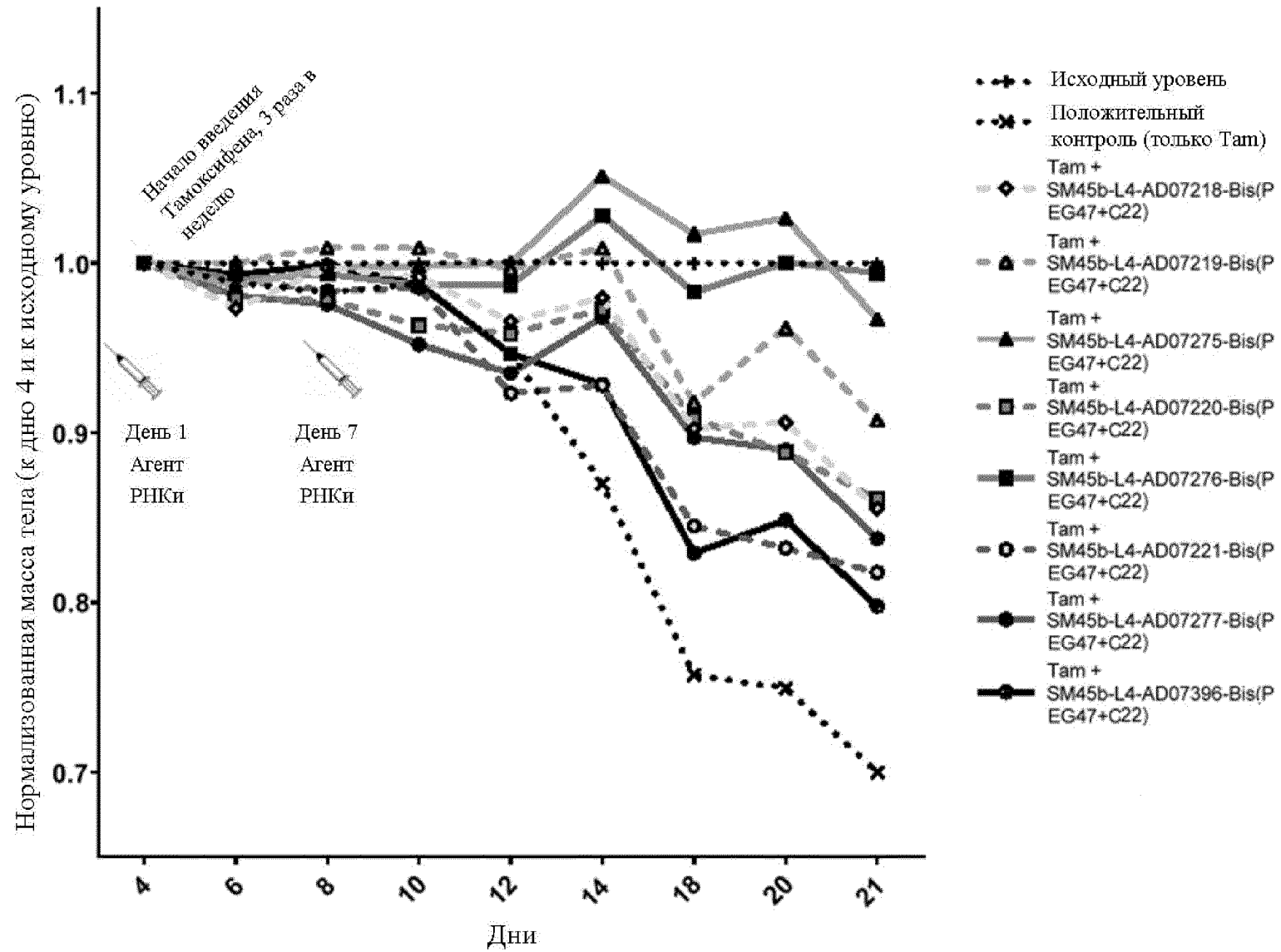
i. смысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, которая содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от тяжа из 15 последовательных нуклеотидов SEQ ID NO:1, и

ii. антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, которая по крайней мере частично является комплементарной смысловой цепи.

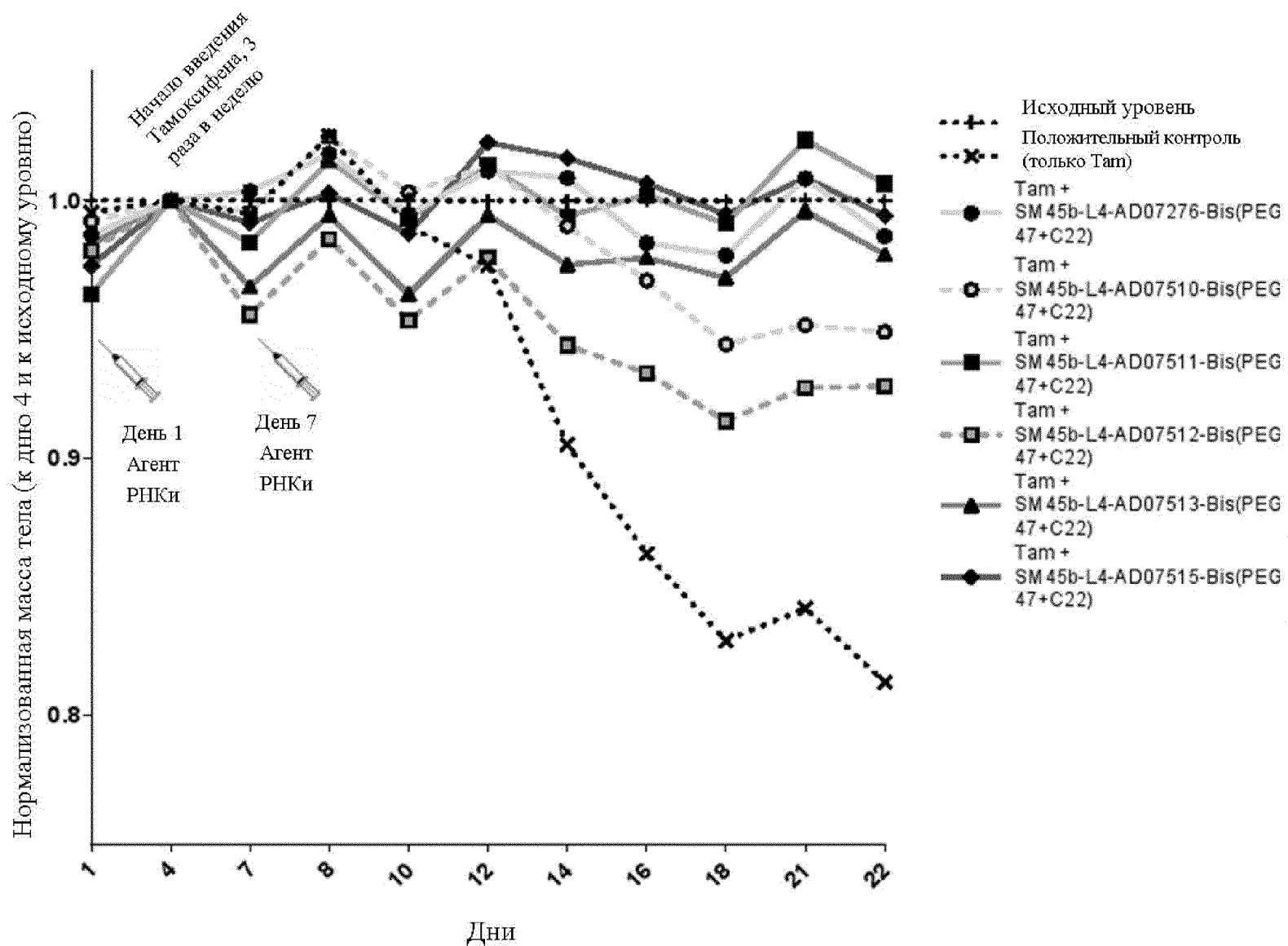
5 56. Агент РНКи для ингибирования экспрессии гена двойного гомеобокса 4 (*DUX4*), включающий:

i. антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, которые по меньшей мере частично являются комплементарными тяжу из 15 последовательных нуклеотидов SEQ ID NO:1, и

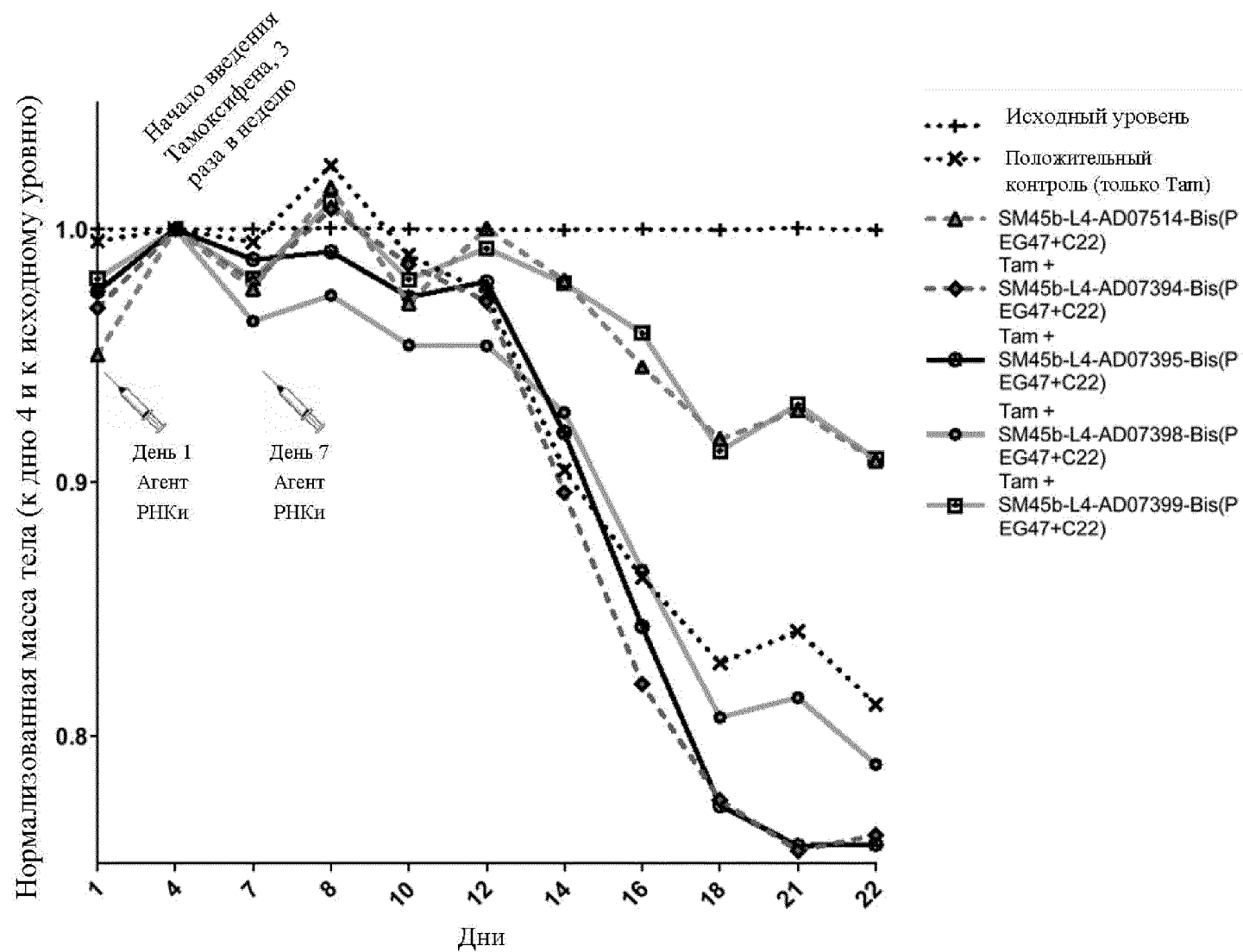
10 ii. смысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере частично является комплементарной антисмысловой цепи.



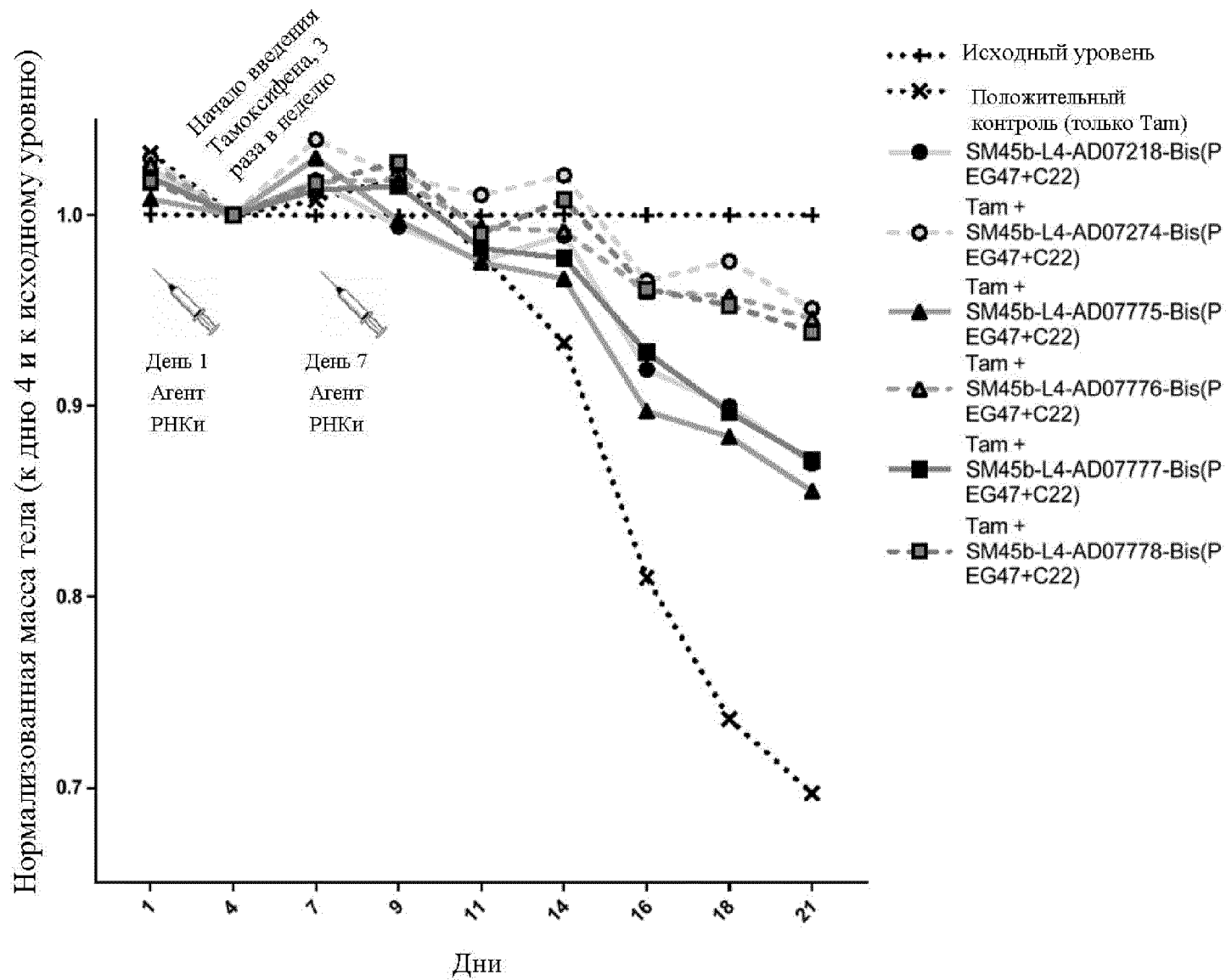
Фиг. 1



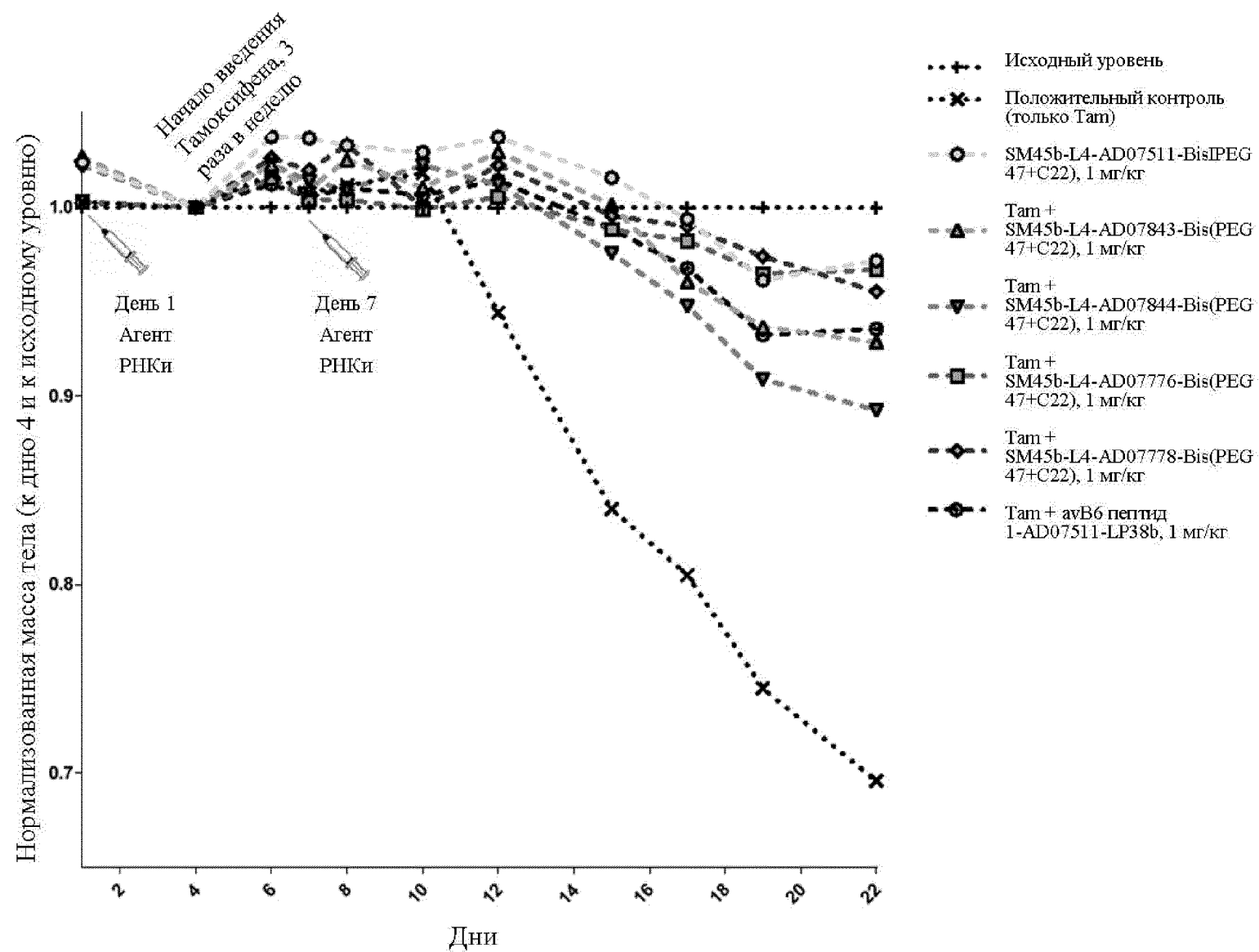
Фиг. 2



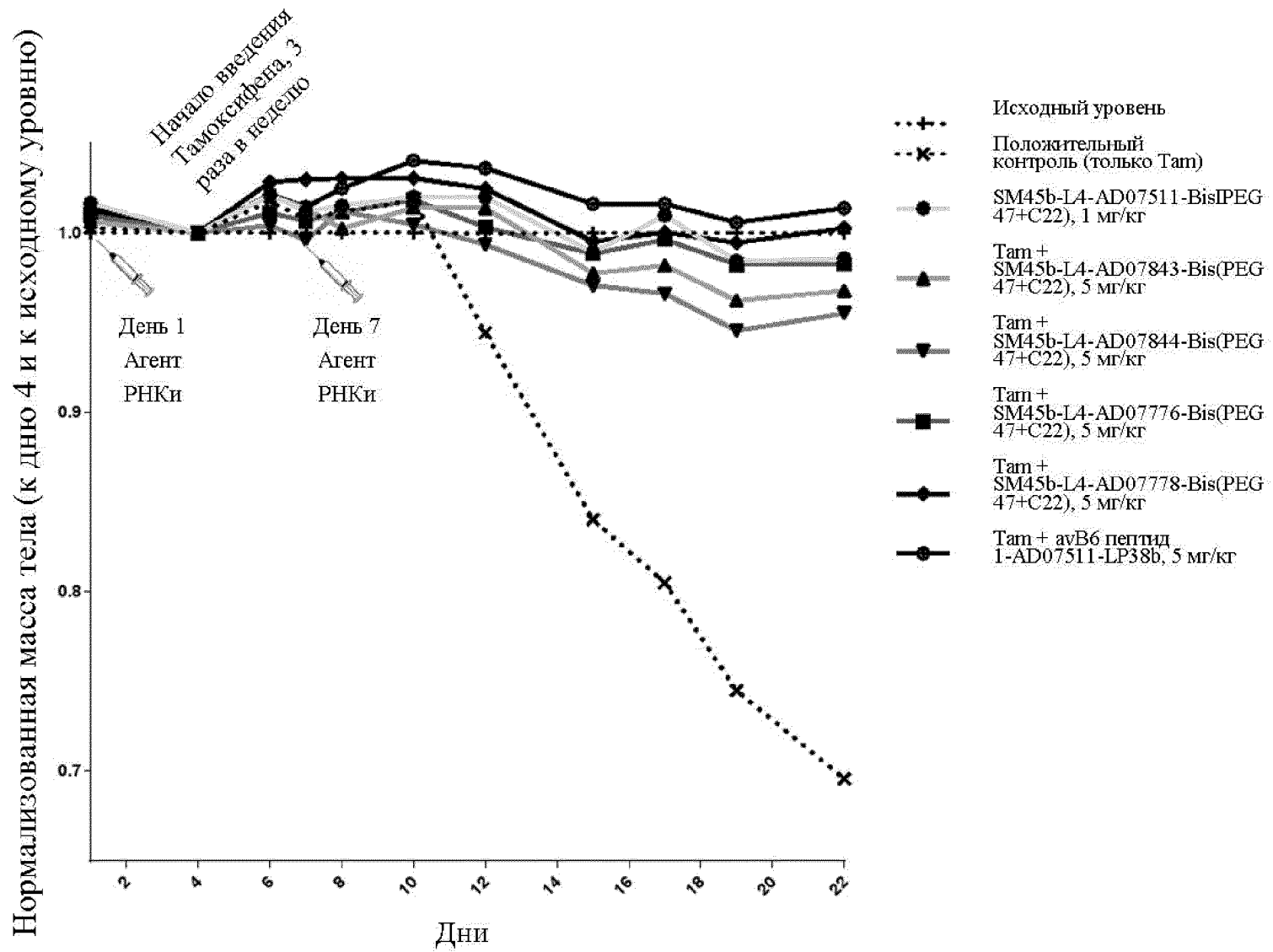
Фиг. 3



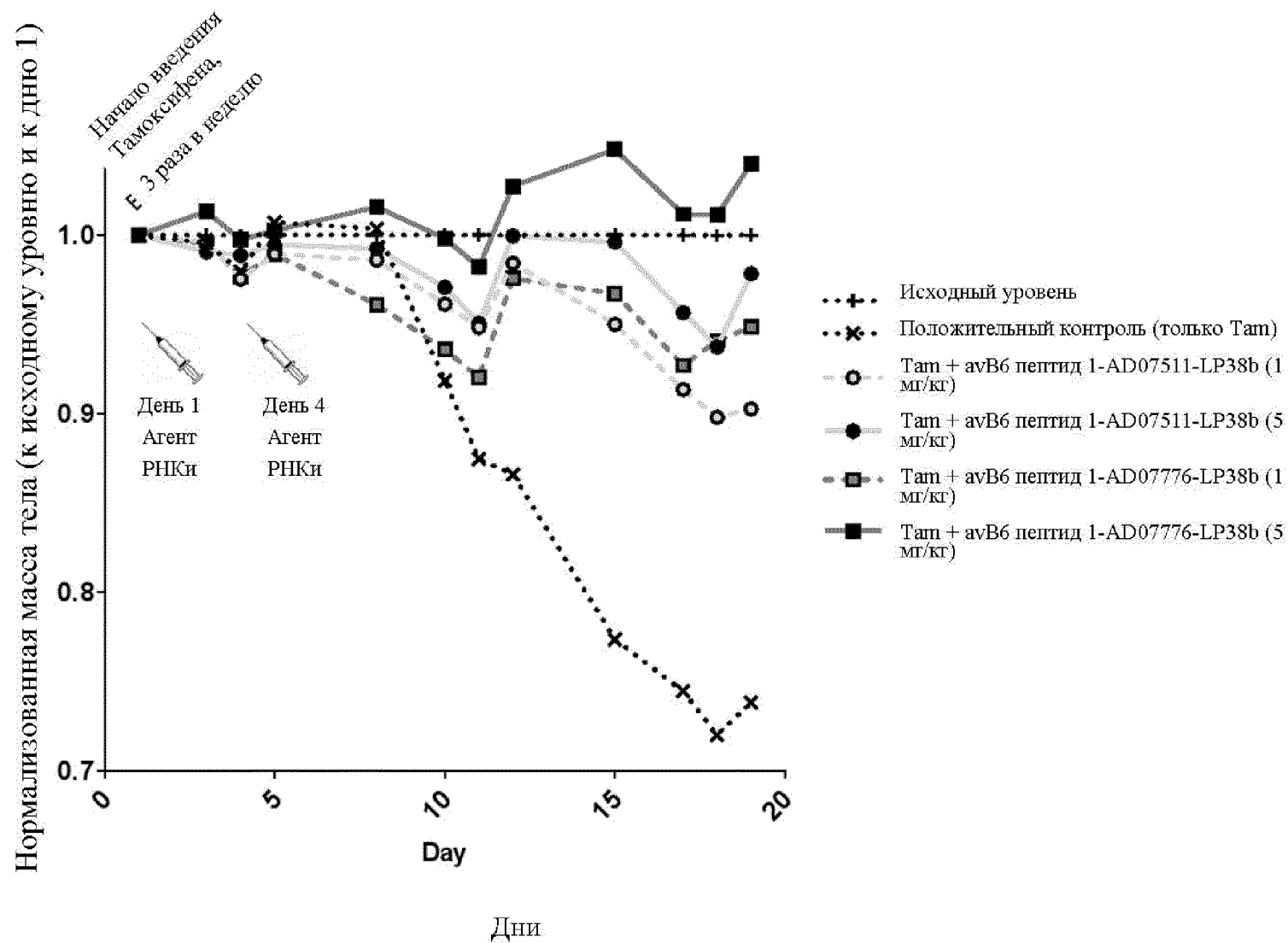
Фиг. 4



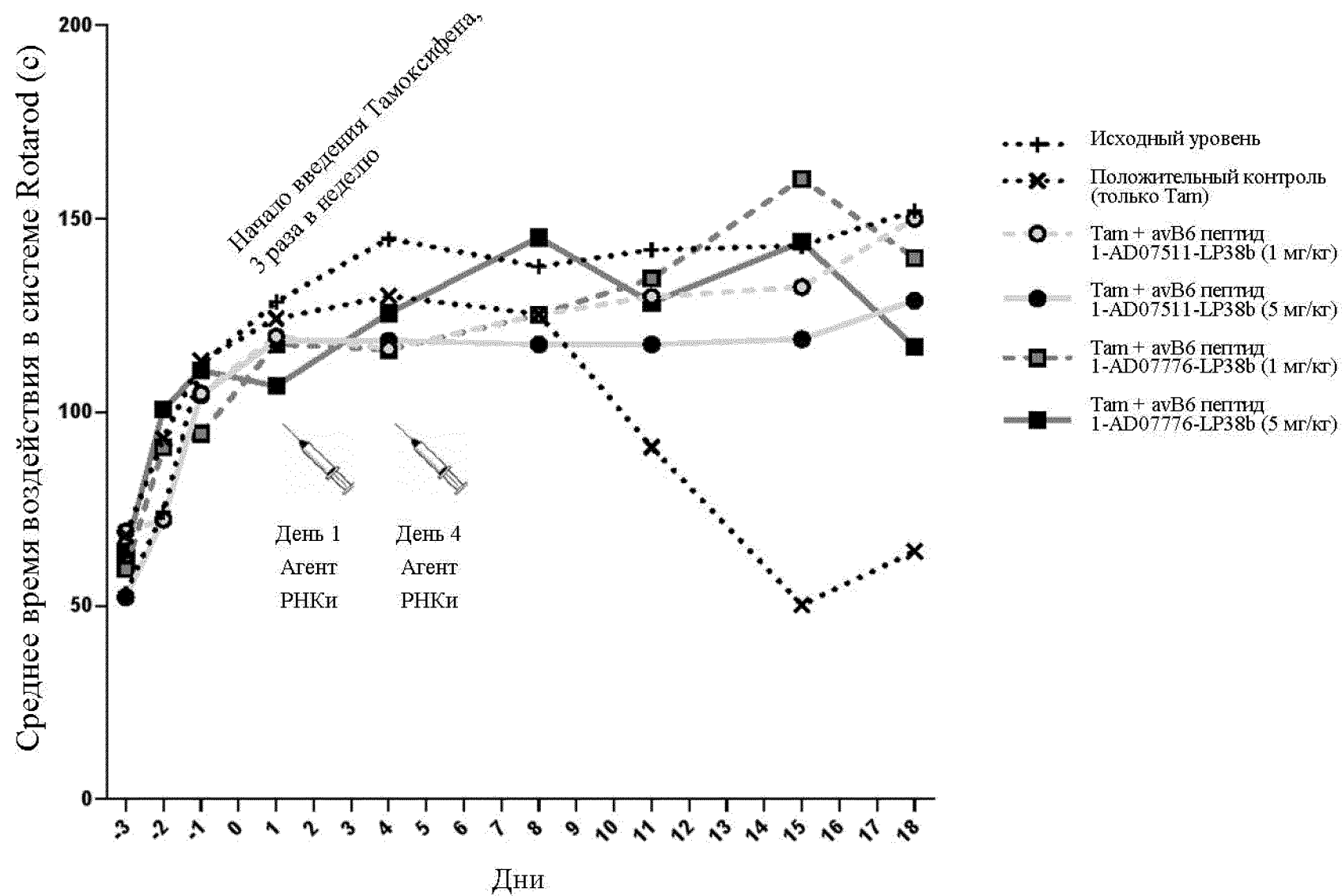
Фиг. 5



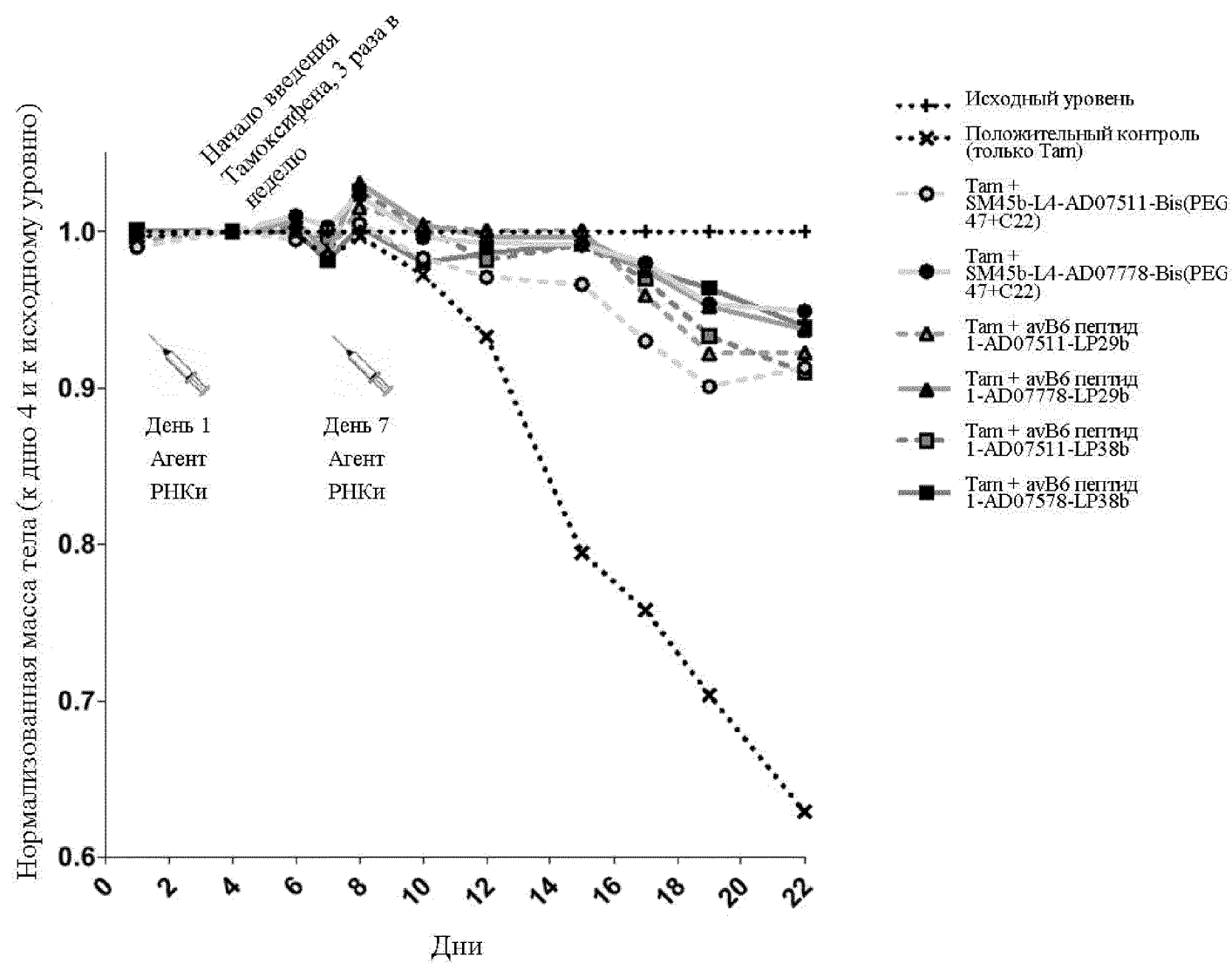
Фиг. 6



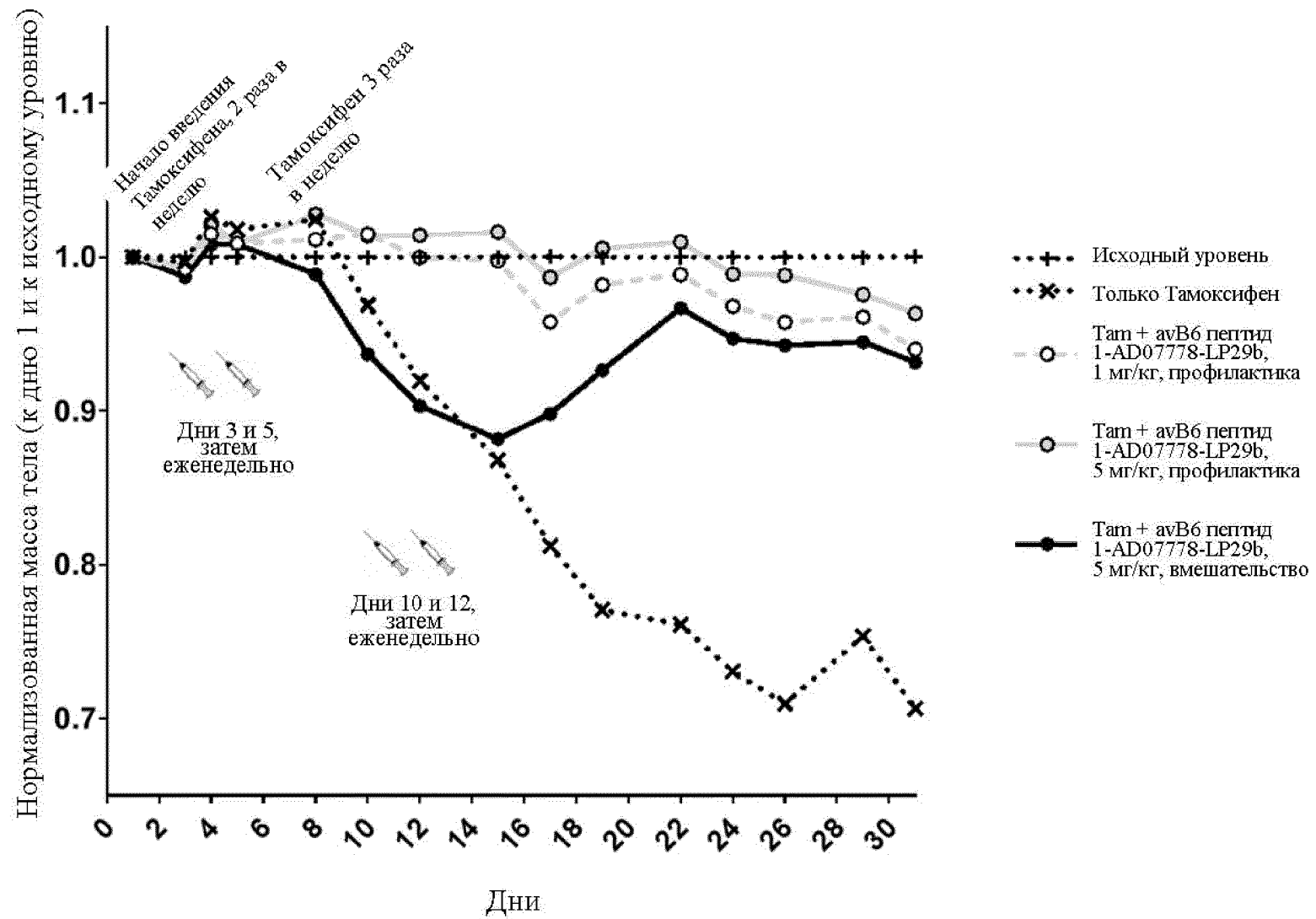
Фиг. 7



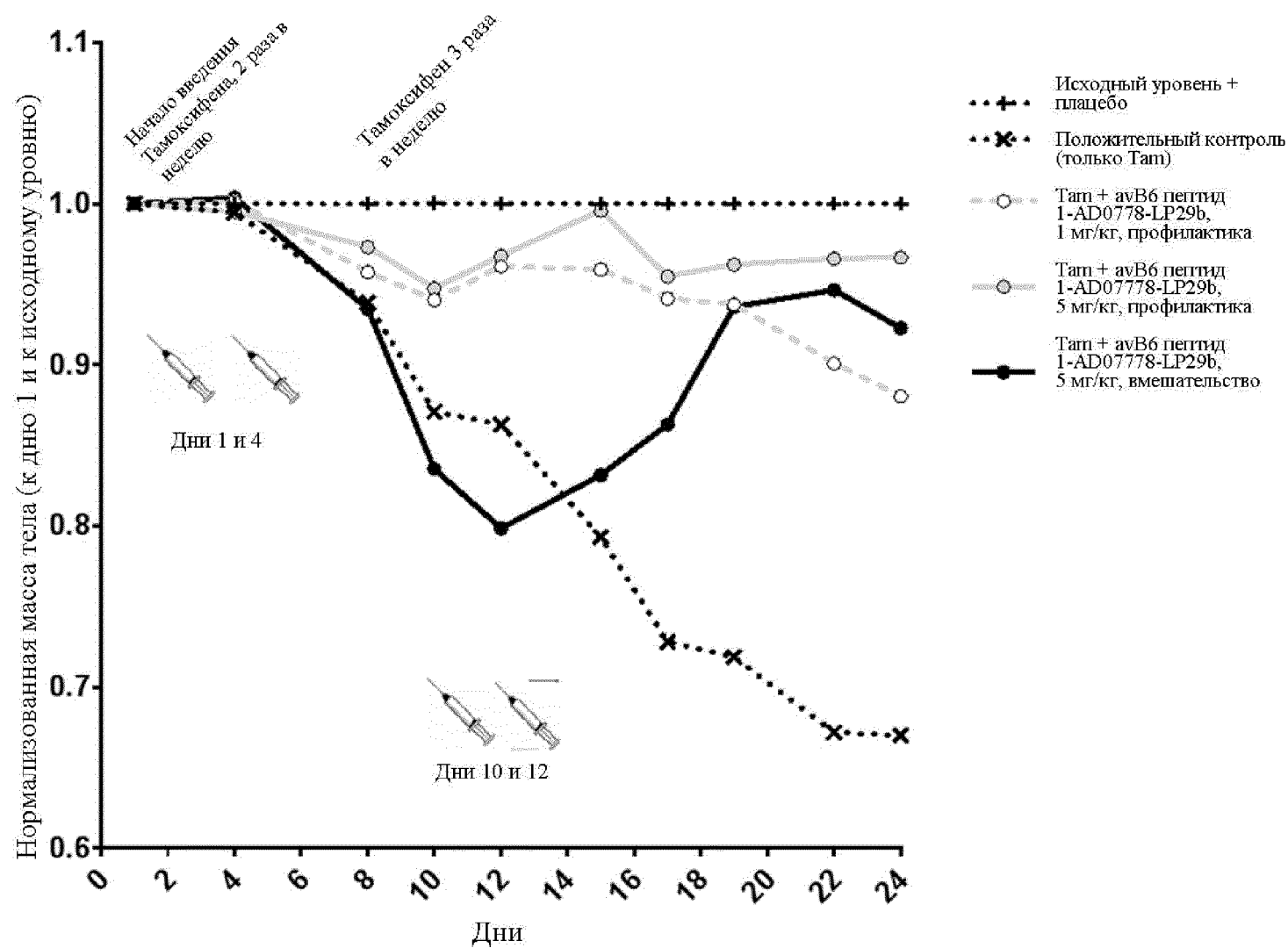
Фиг. 8



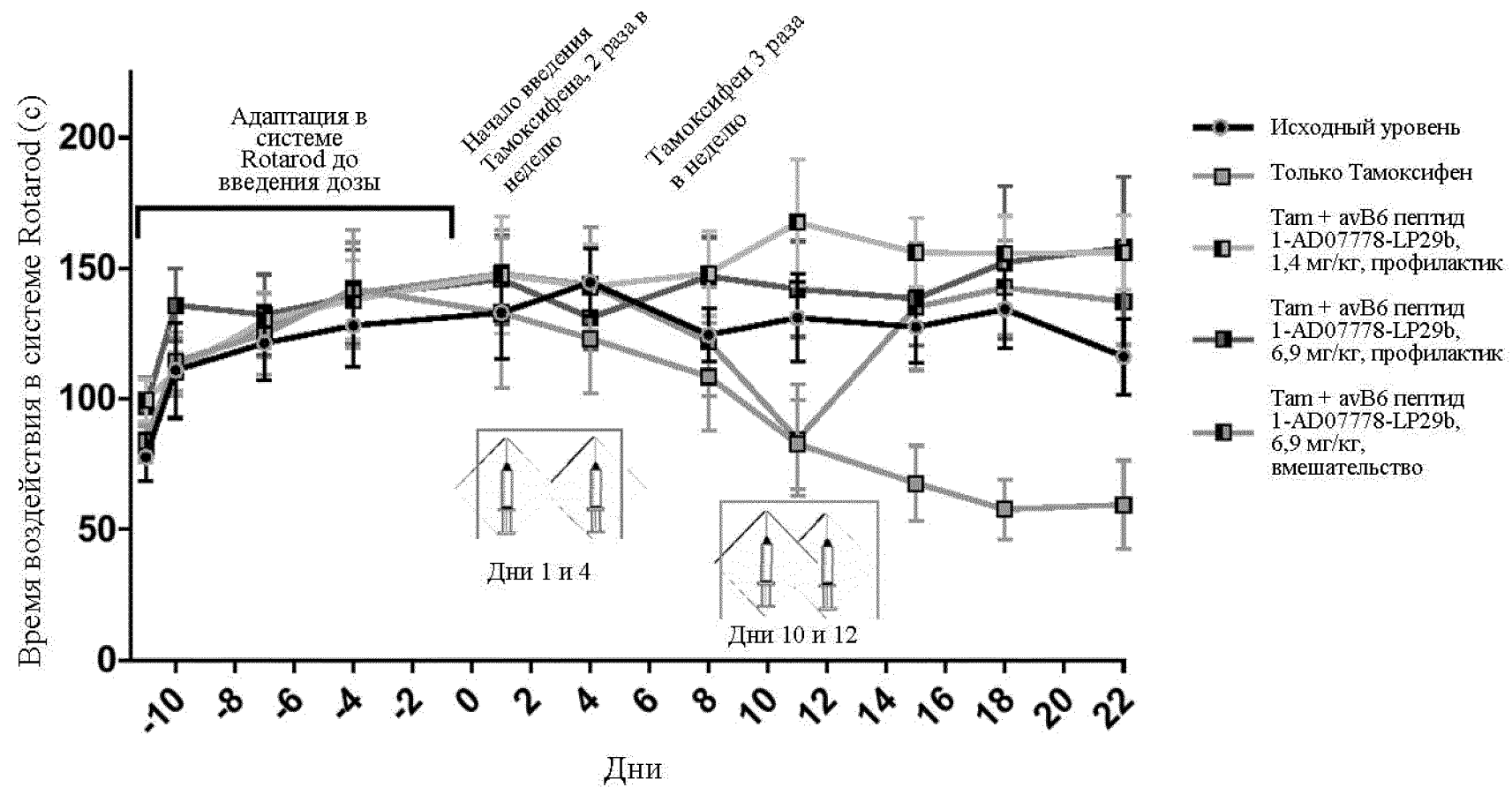
Фиг. 9



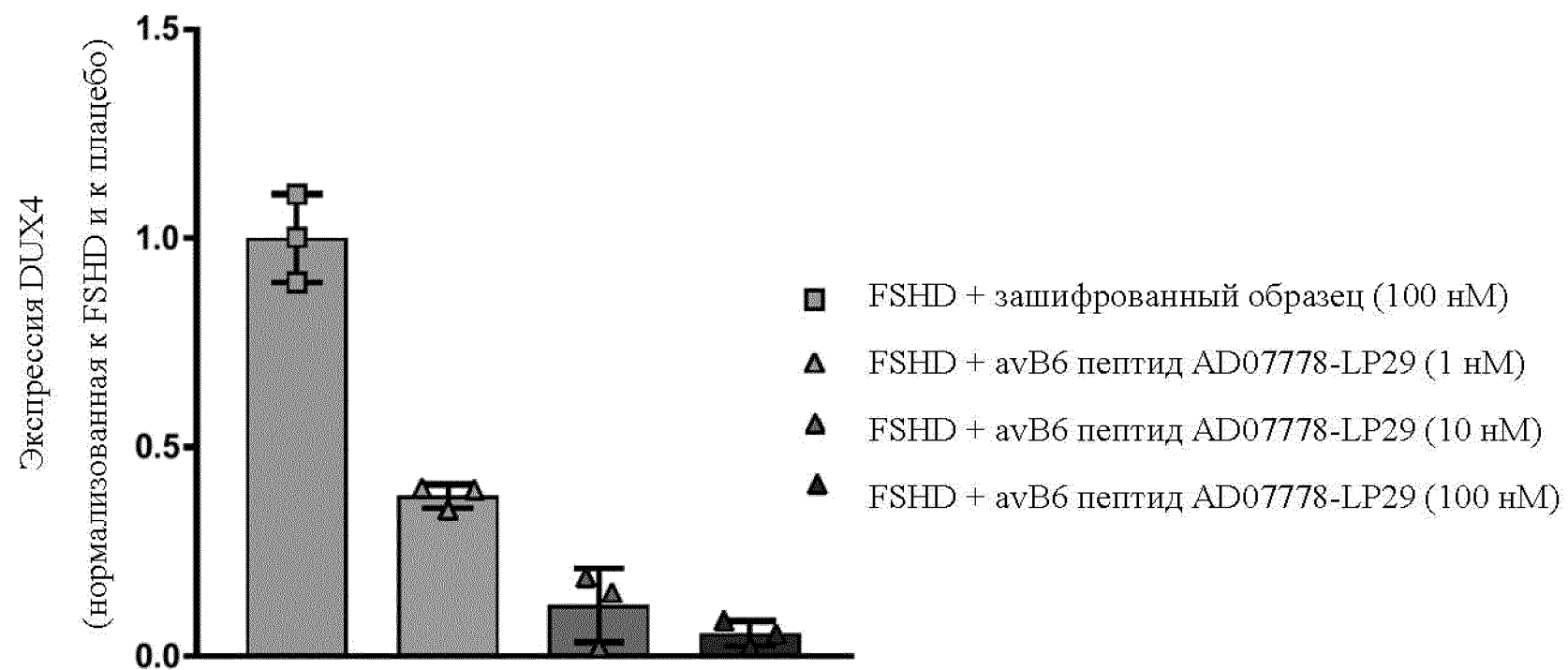
Фиг. 10



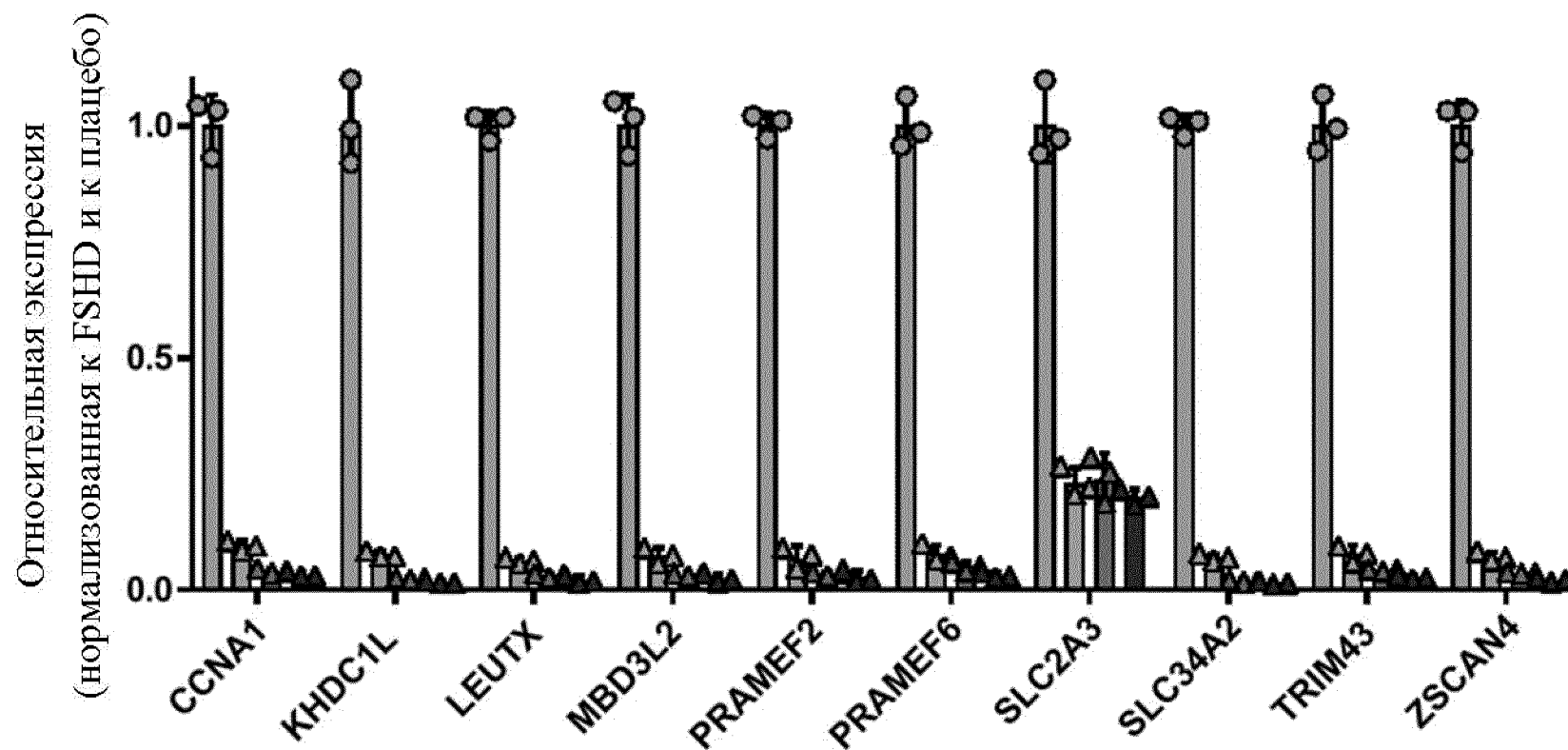
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15А



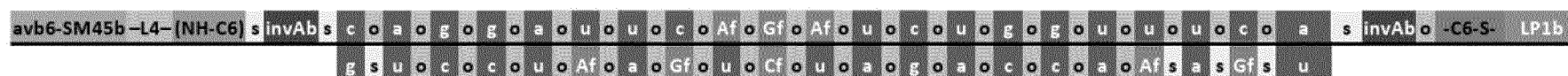
Фиг. 15Б



Фиг. 15В

AC000280

Смысловая цепь (5' → 3')

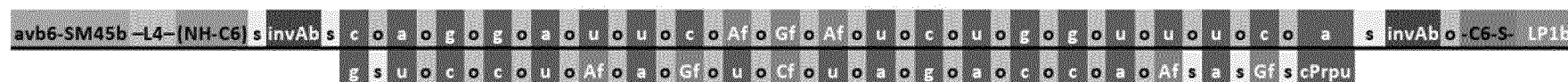


Антисмысловая цепь (3' ← 5')

Фиг. 15Г

AD000281

Смысловая цепь (5' → 3')

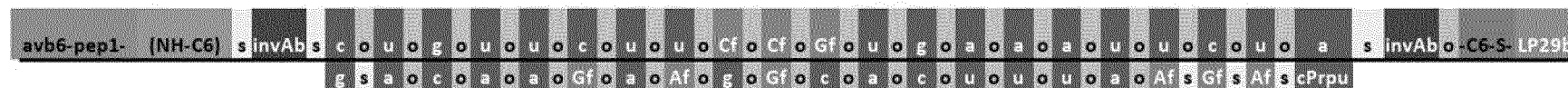


Антисмысловая цепь (3' ← 5')

Фиг. 15Д

AC000446

Смысловая цепь (5' → 3')

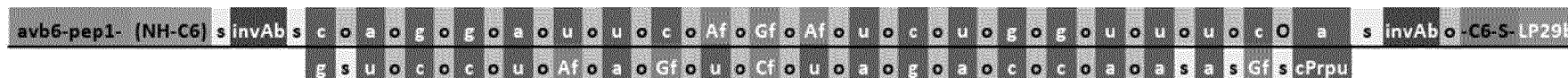


Антисмысловая цепь (3' ← 5')

Фиг. 15Е

AC000447

Смысловая цепь (5' → 3')

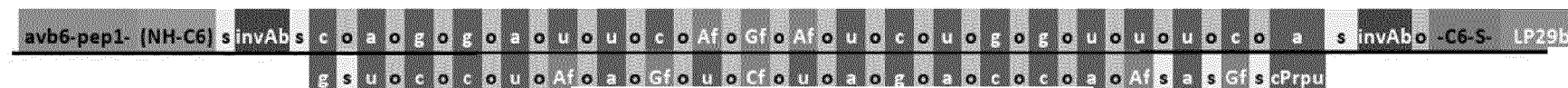


Антисмысловая цепь (3' ← 5')

Фиг. 15Ж

AD000448

Смысловая цепь (5' → 3')



Антисмысловая цепь (3' ← 5')

Фиг. 15З

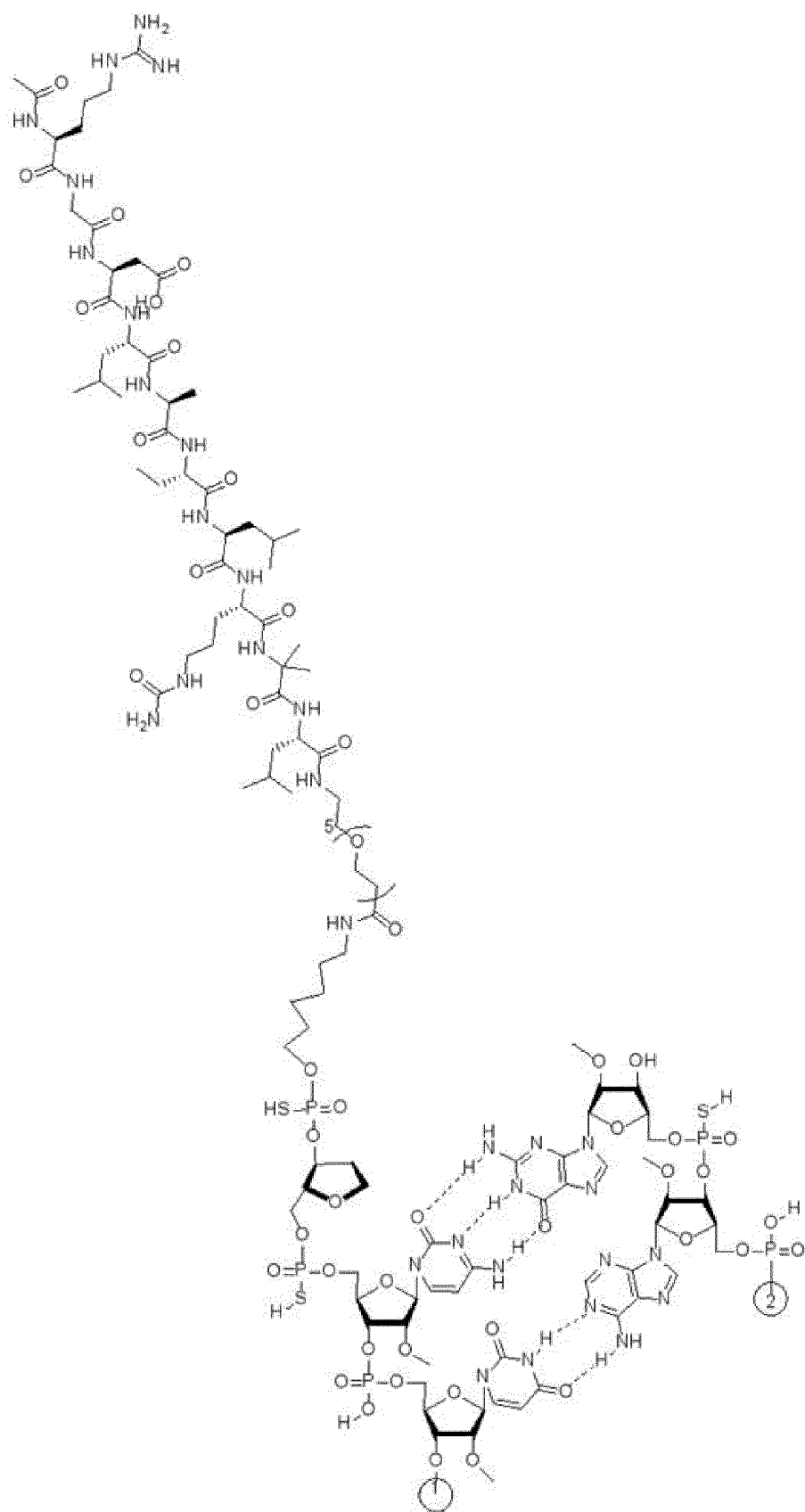
AC000449

Смысловая цепь (5' → 3')

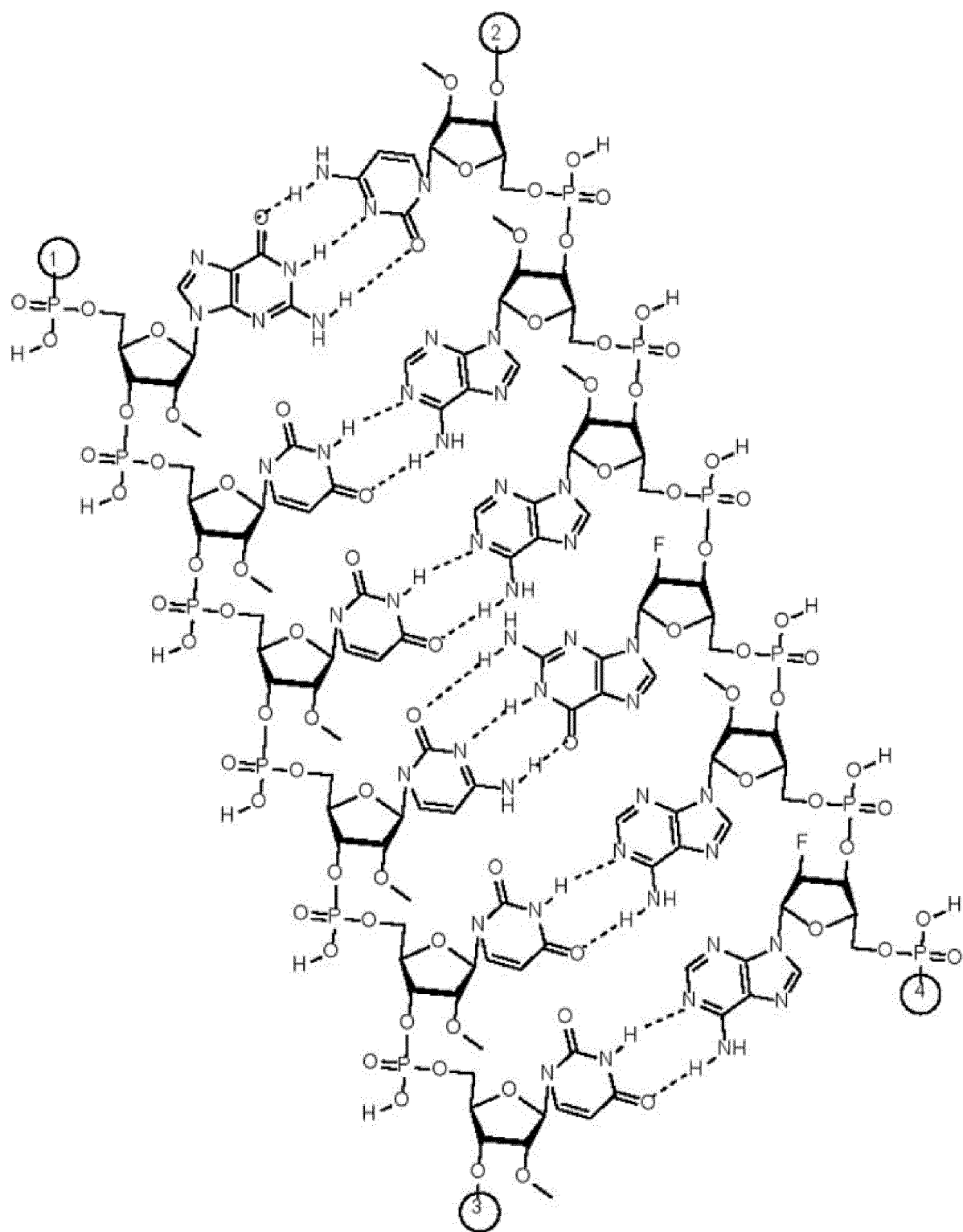


Антисмысловая цепь (3' ← 5')

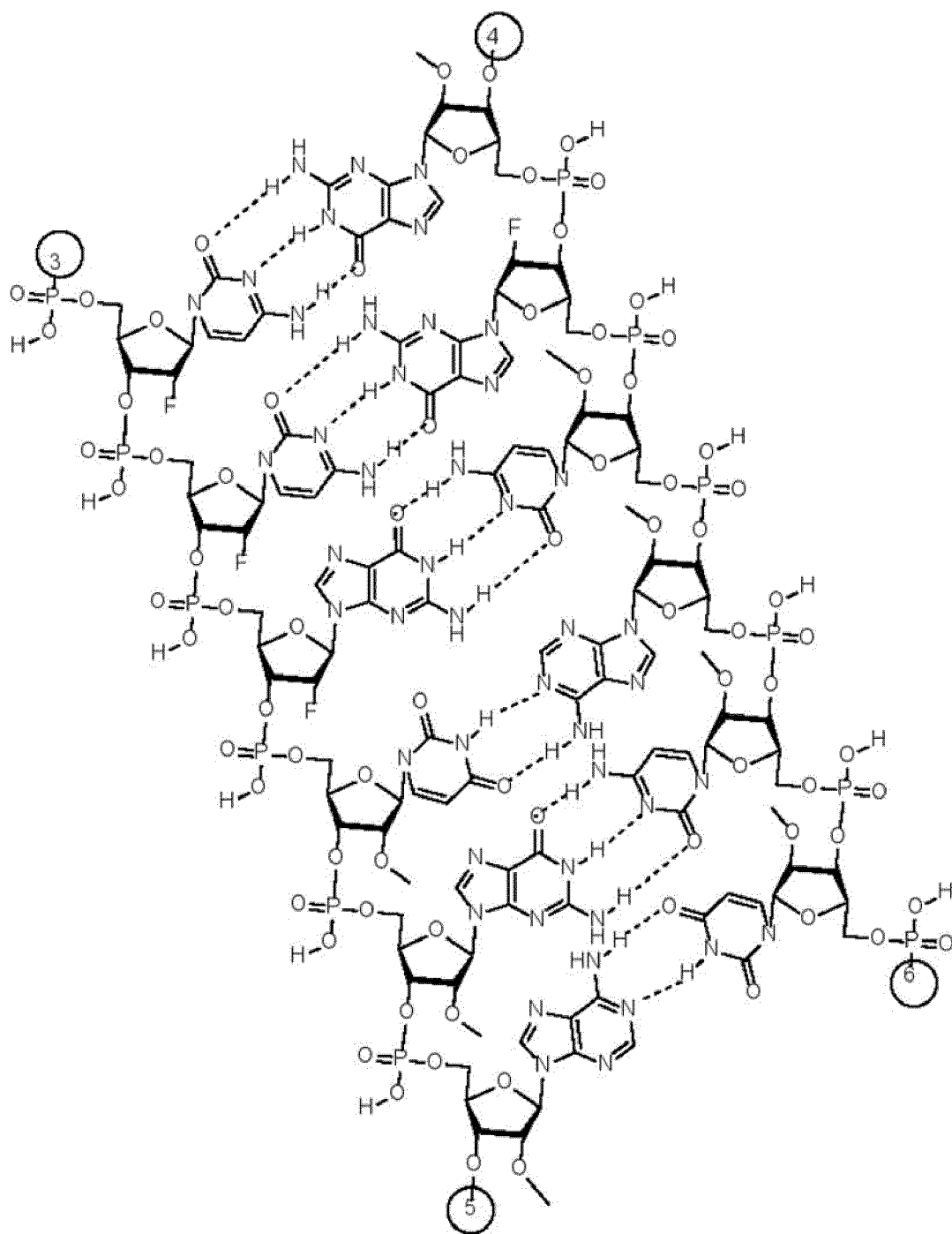
Фиг. 15И



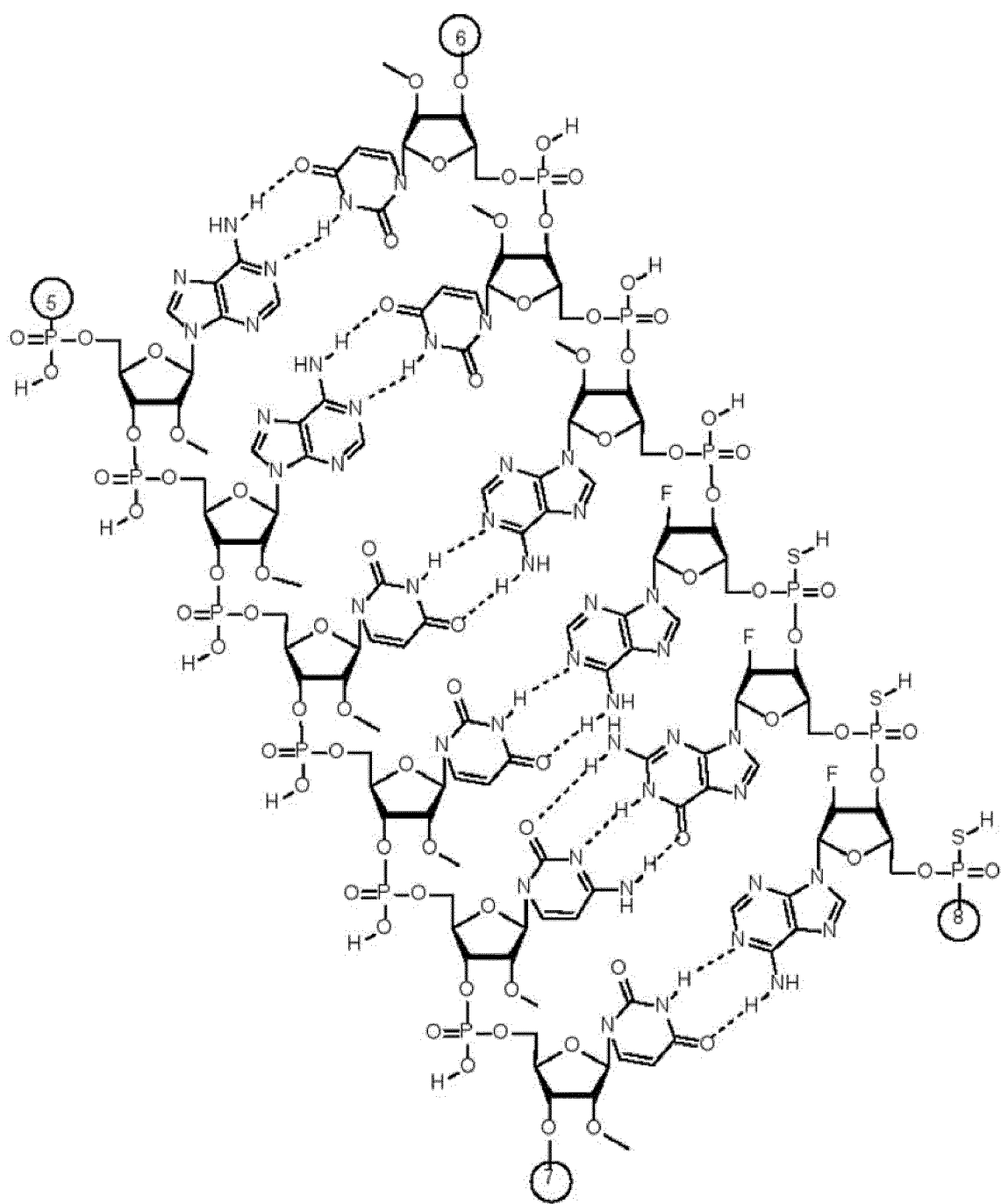
Фиг. 16А



Фиг. 16Б

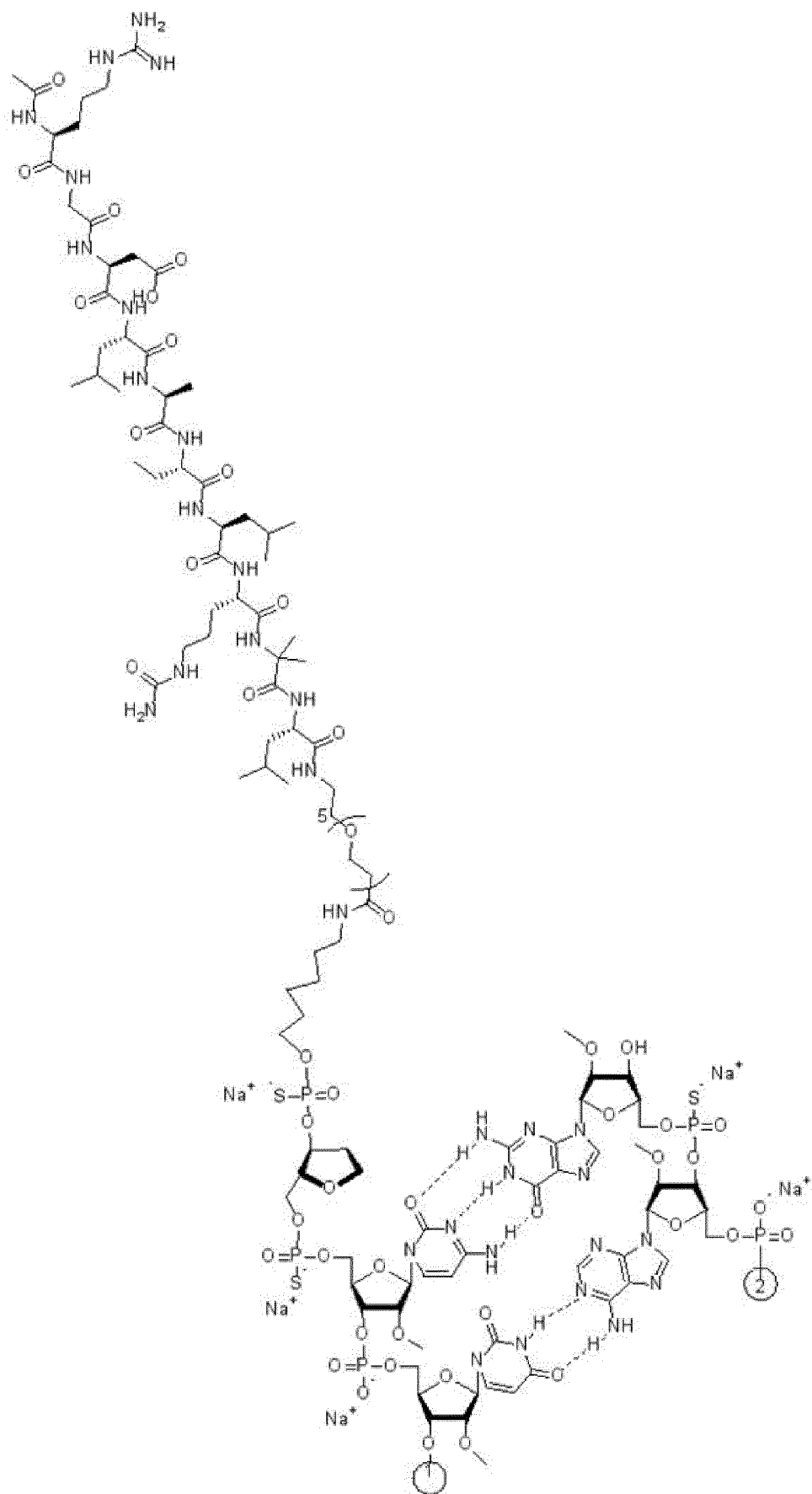


Фиг. 16В

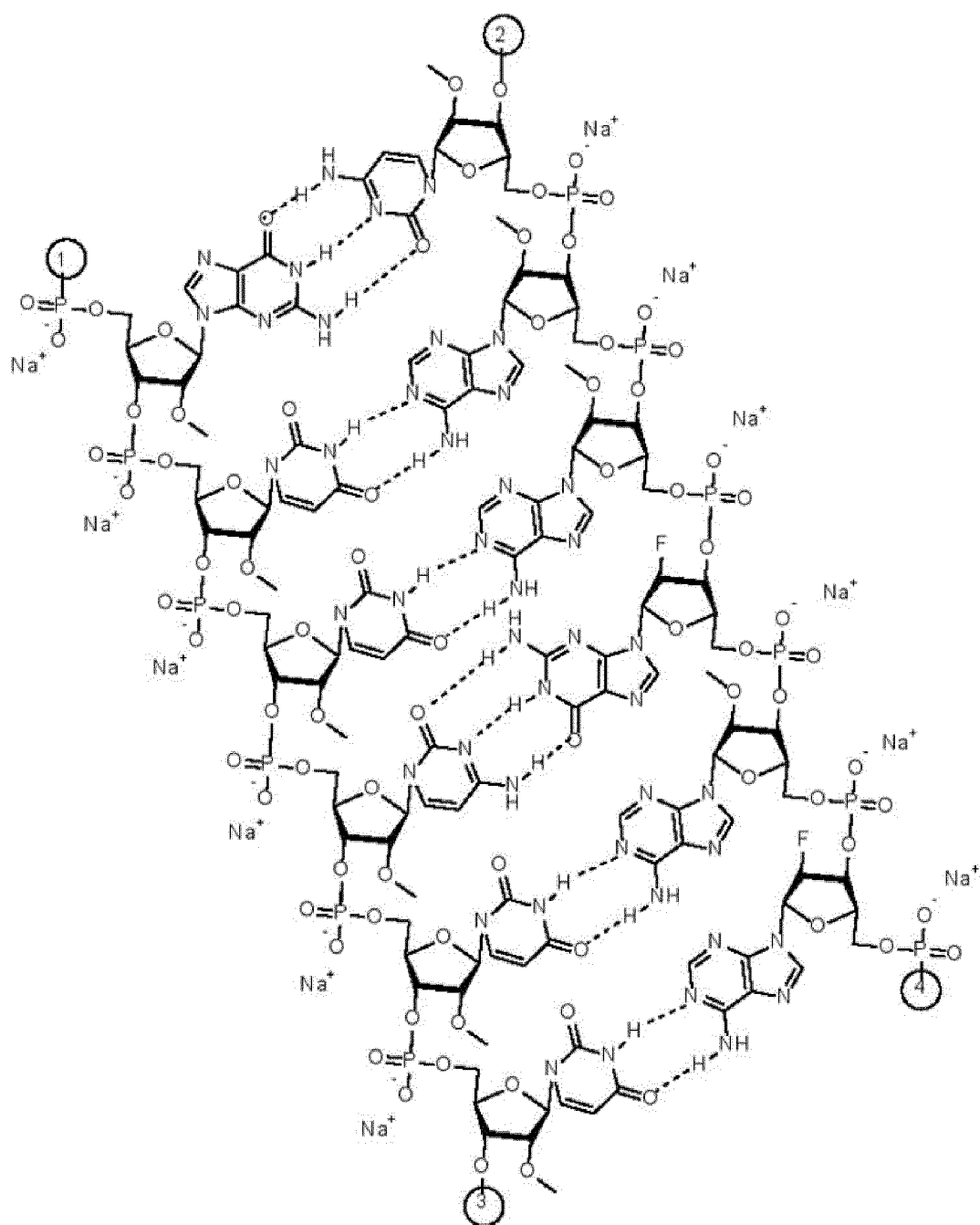


Фиг. 16Г

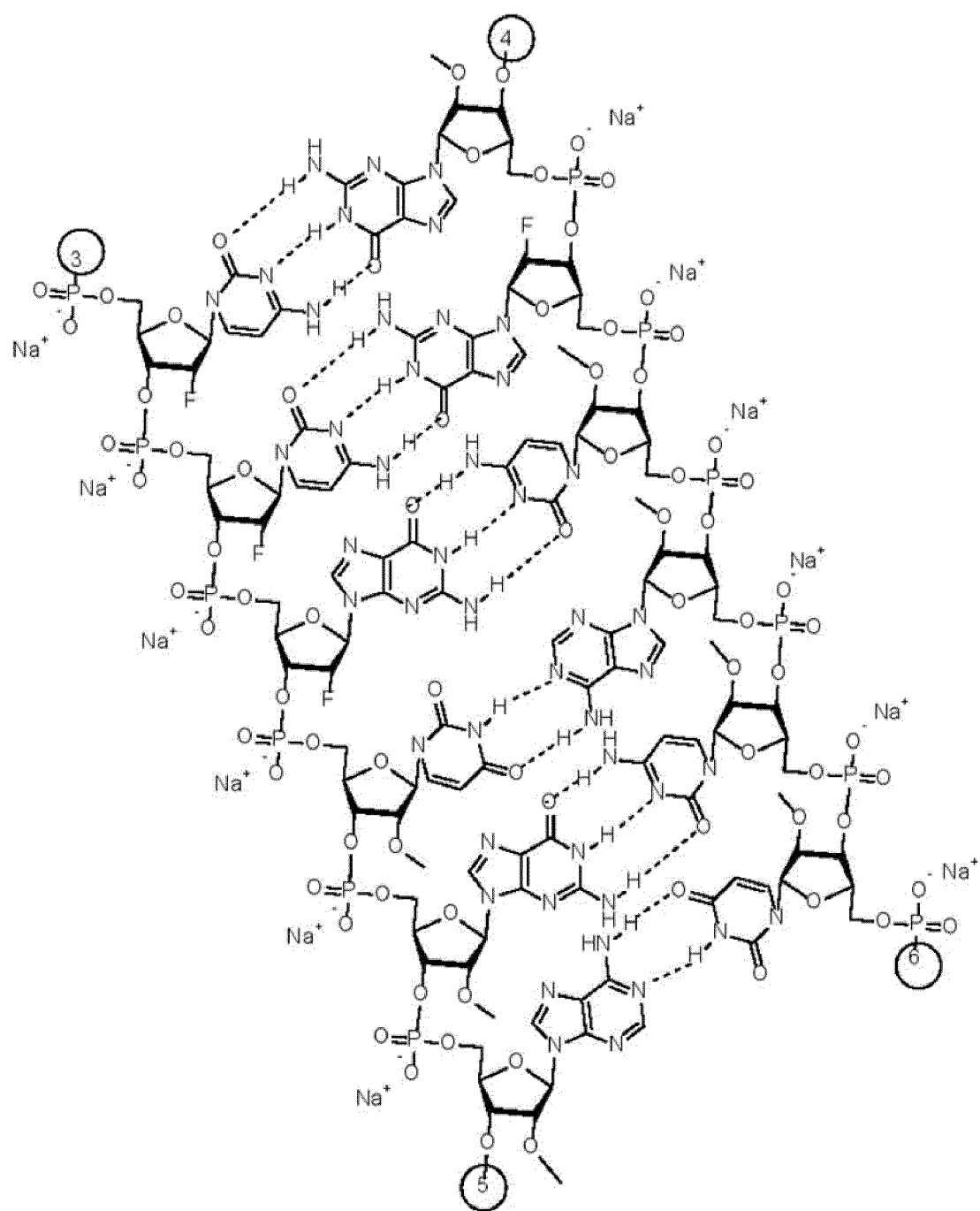
ФИГ. 16Д



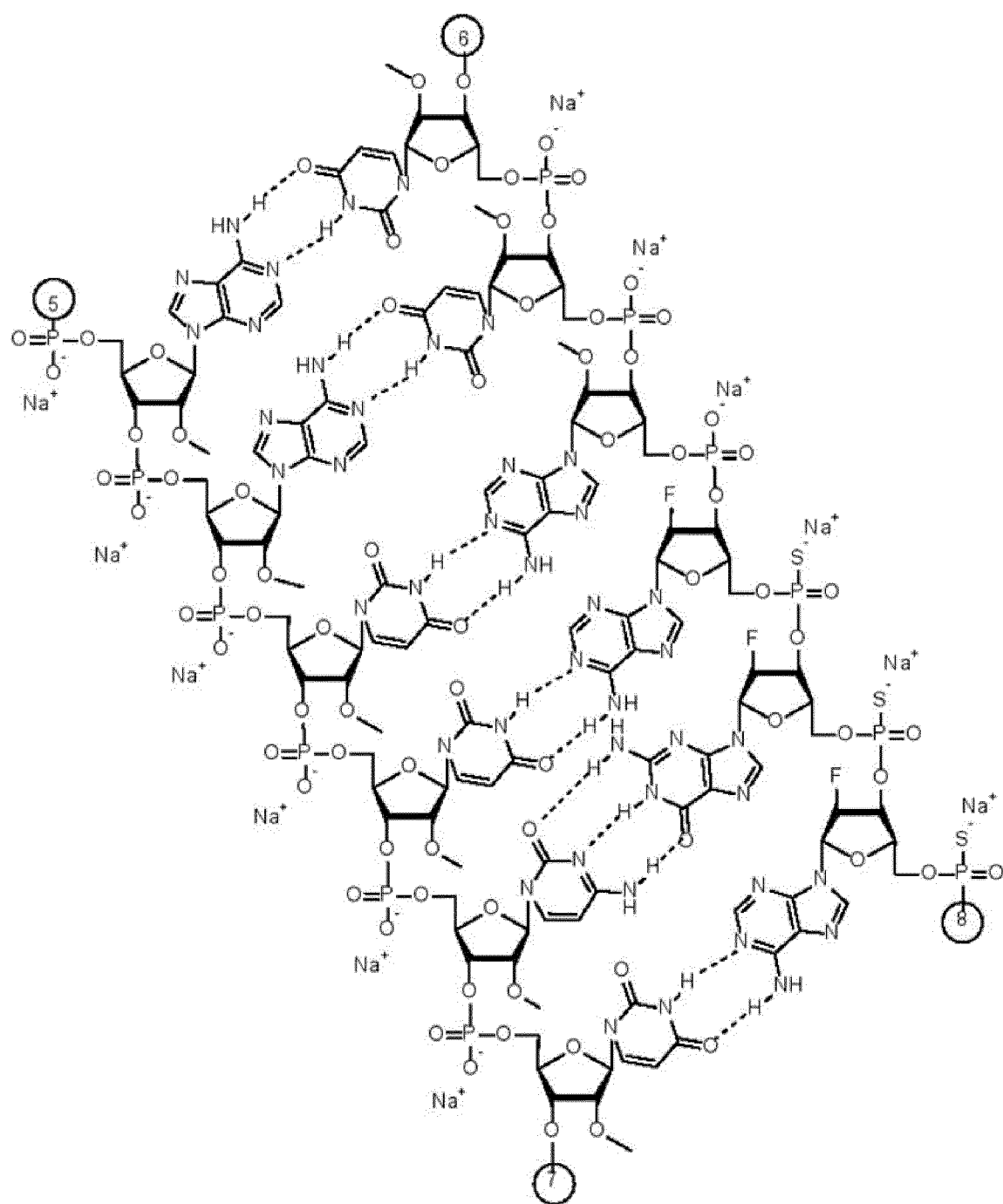
Фиг. 17А



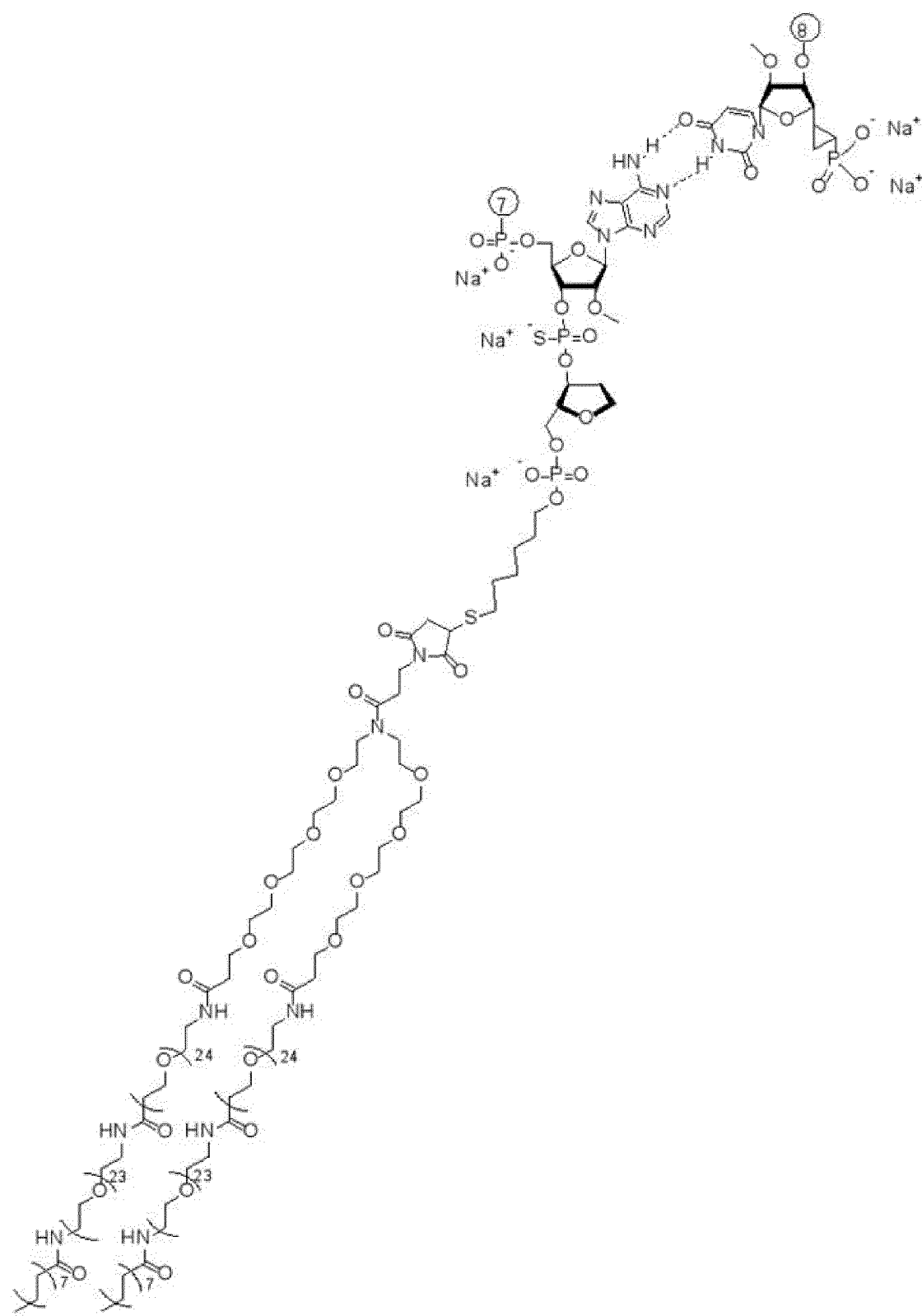
Фиг. 17Б



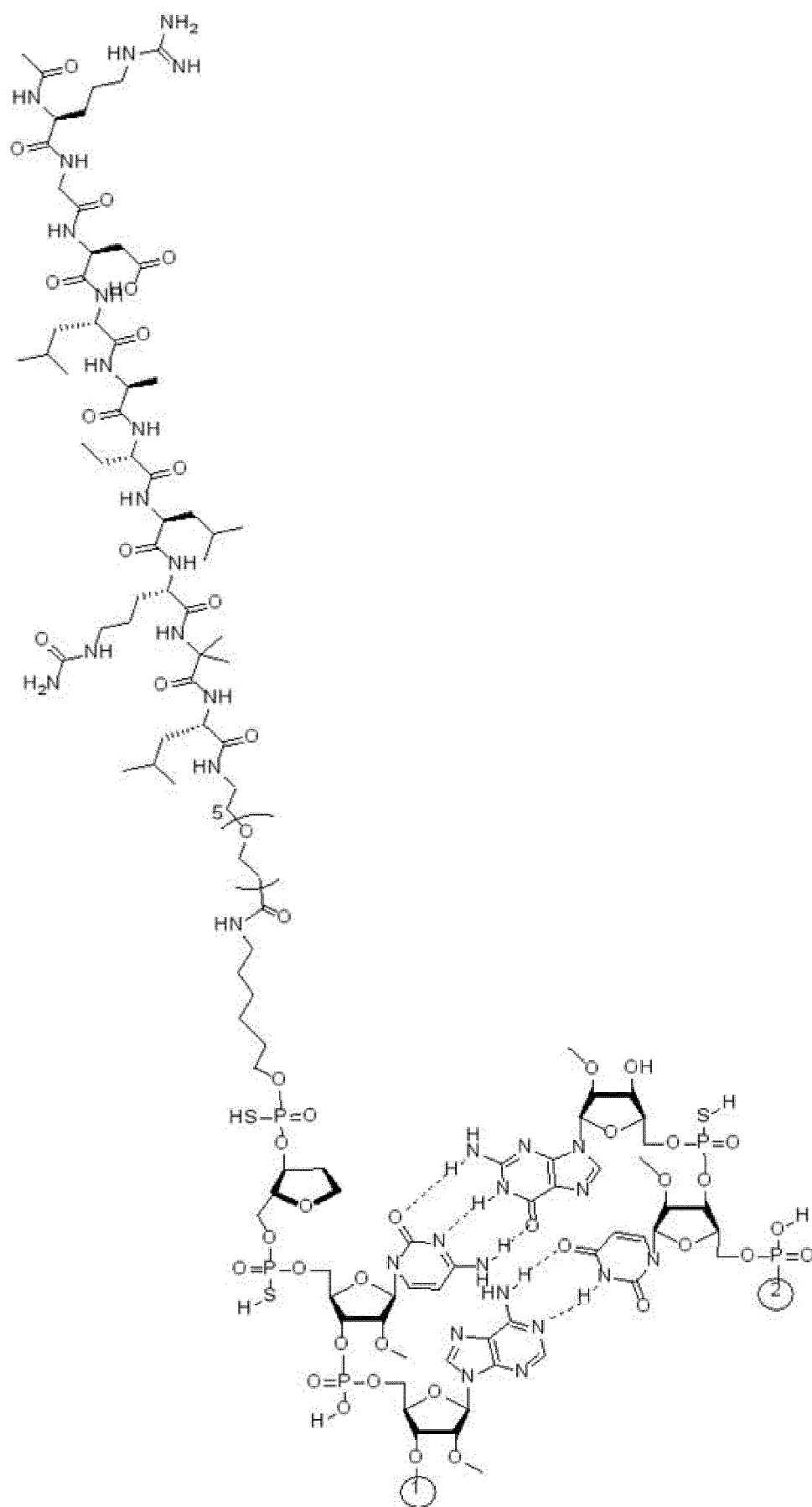
Фиг. 17В



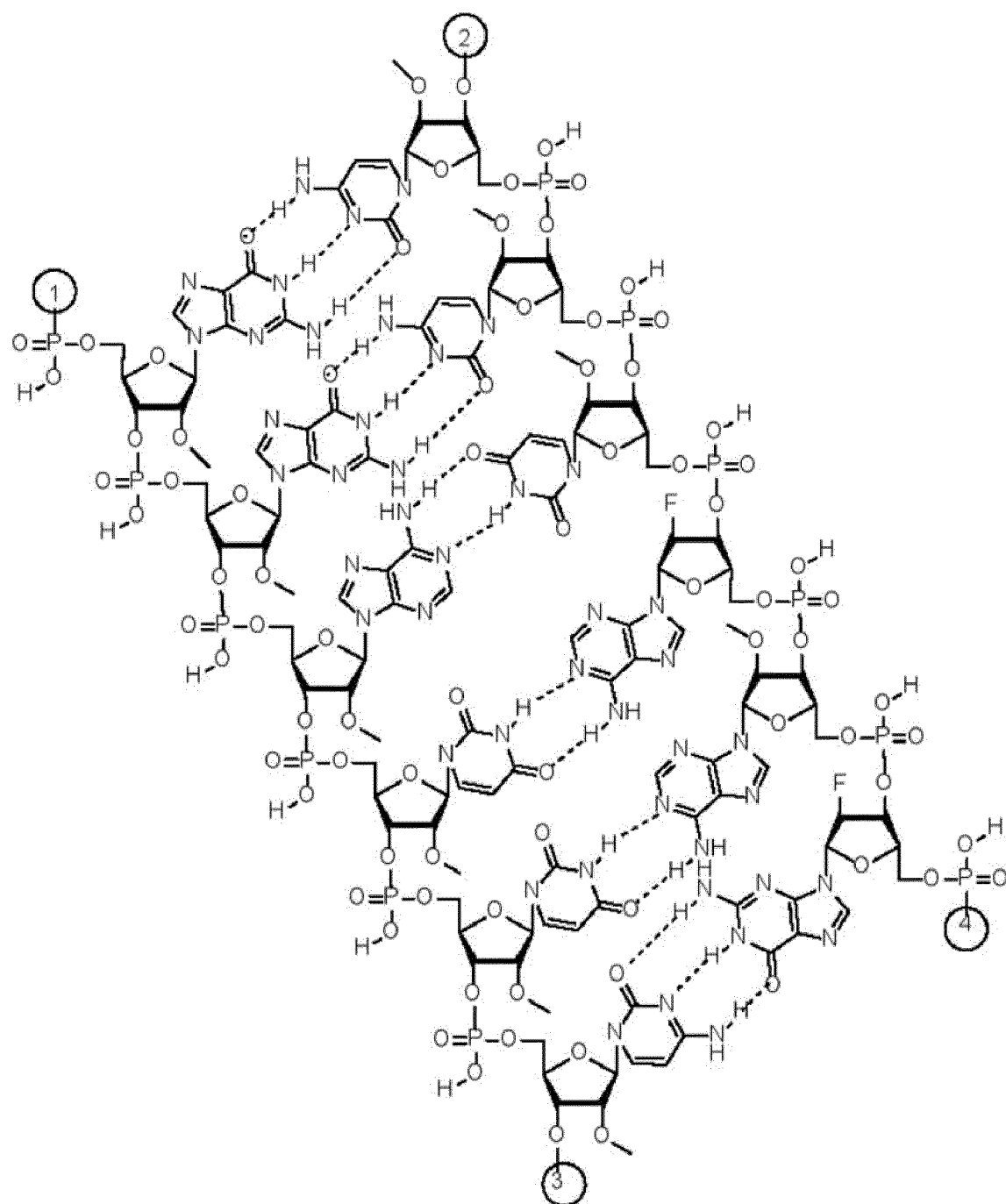
Фиг. 17Г



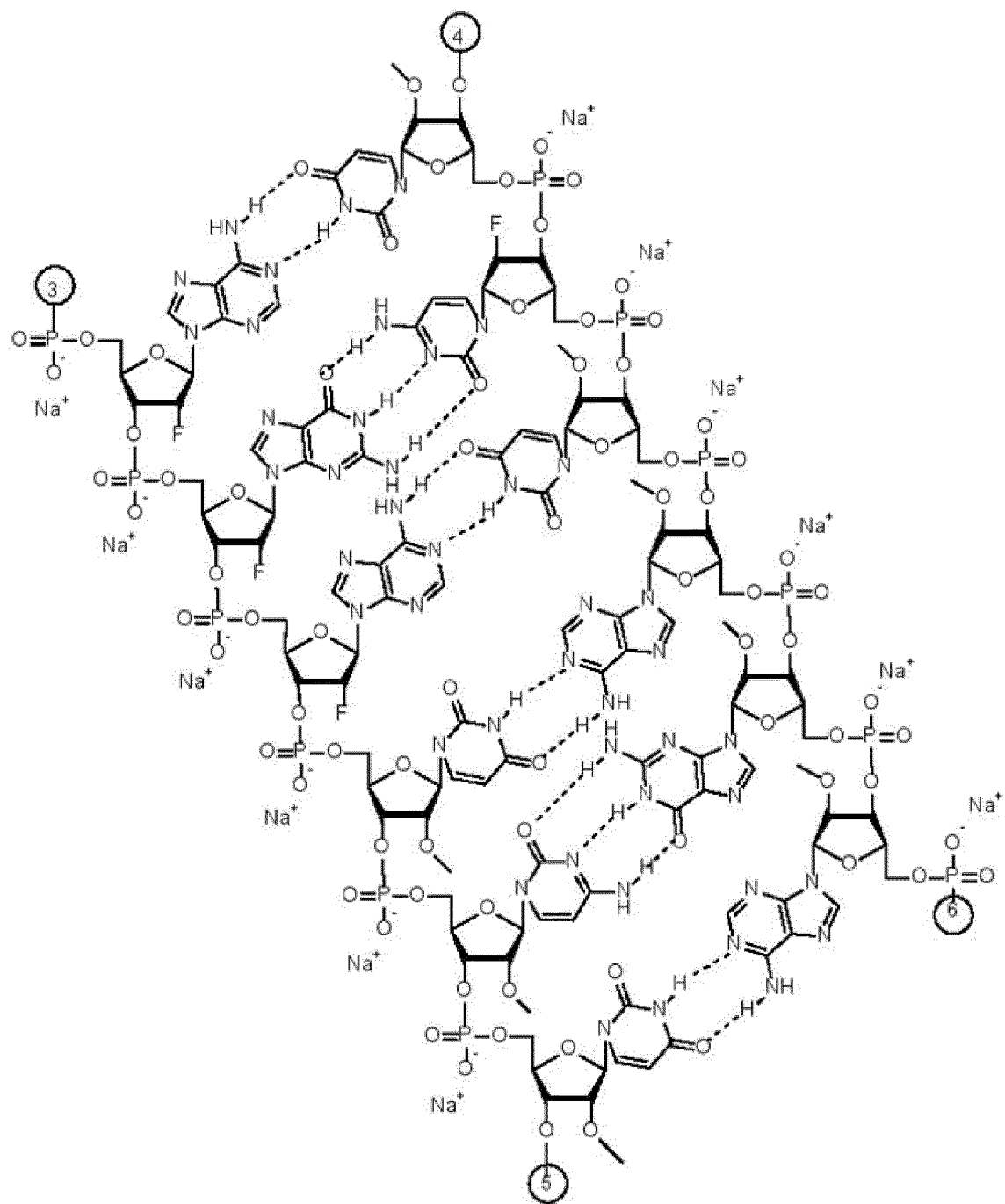
Фиг. 17Д



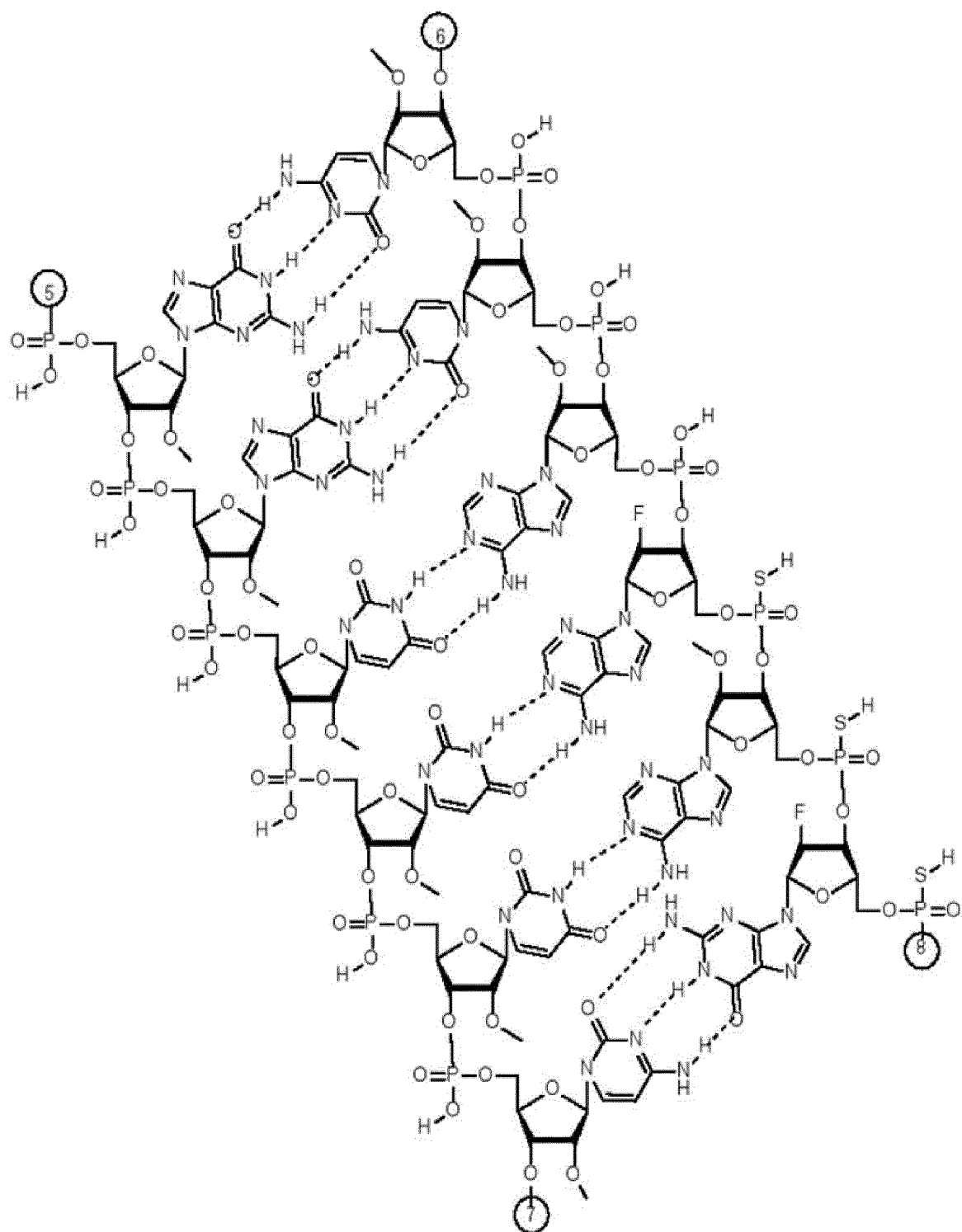
Фиг. 18А



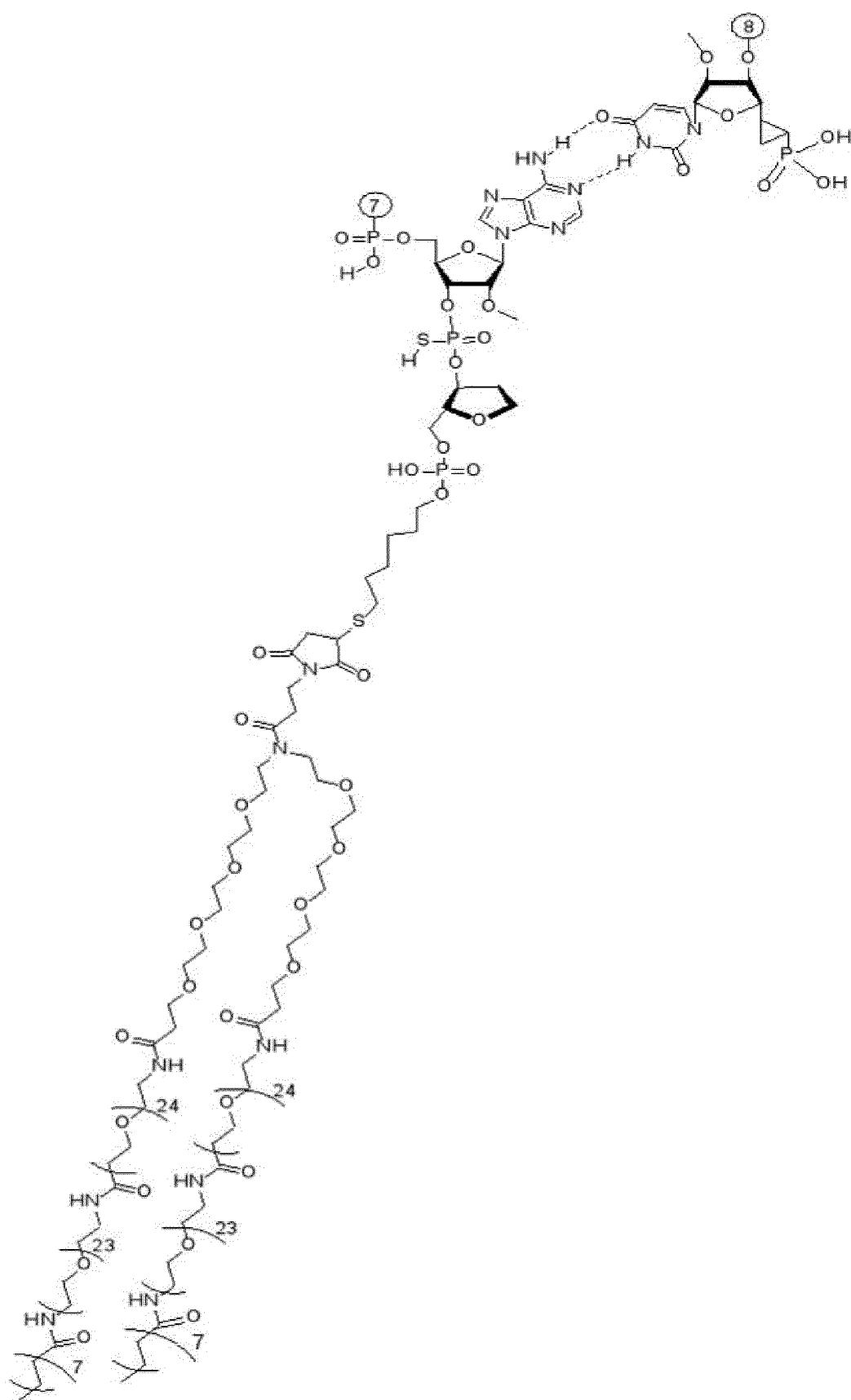
Фиг. 18Б



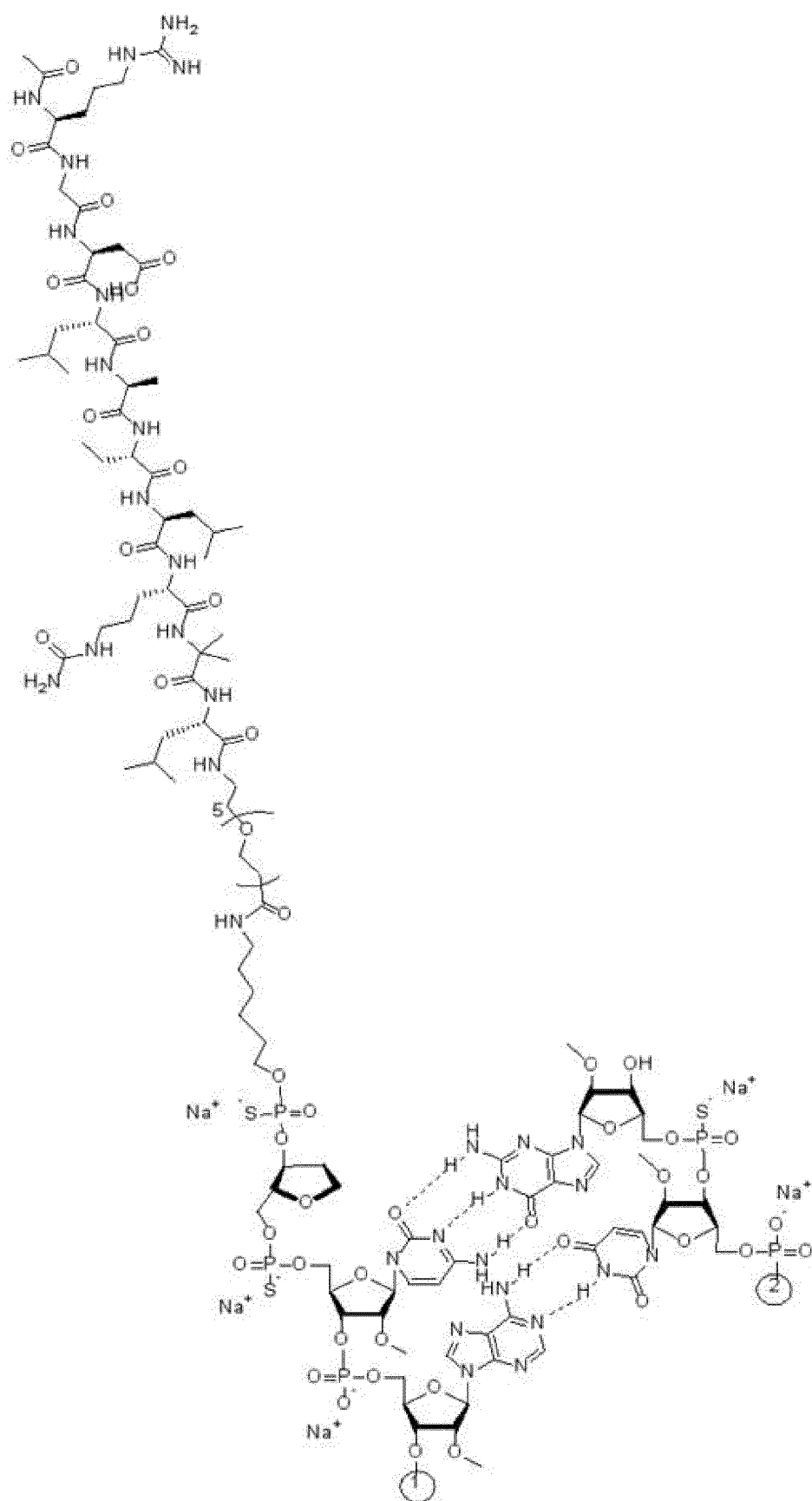
Фиг. 18В



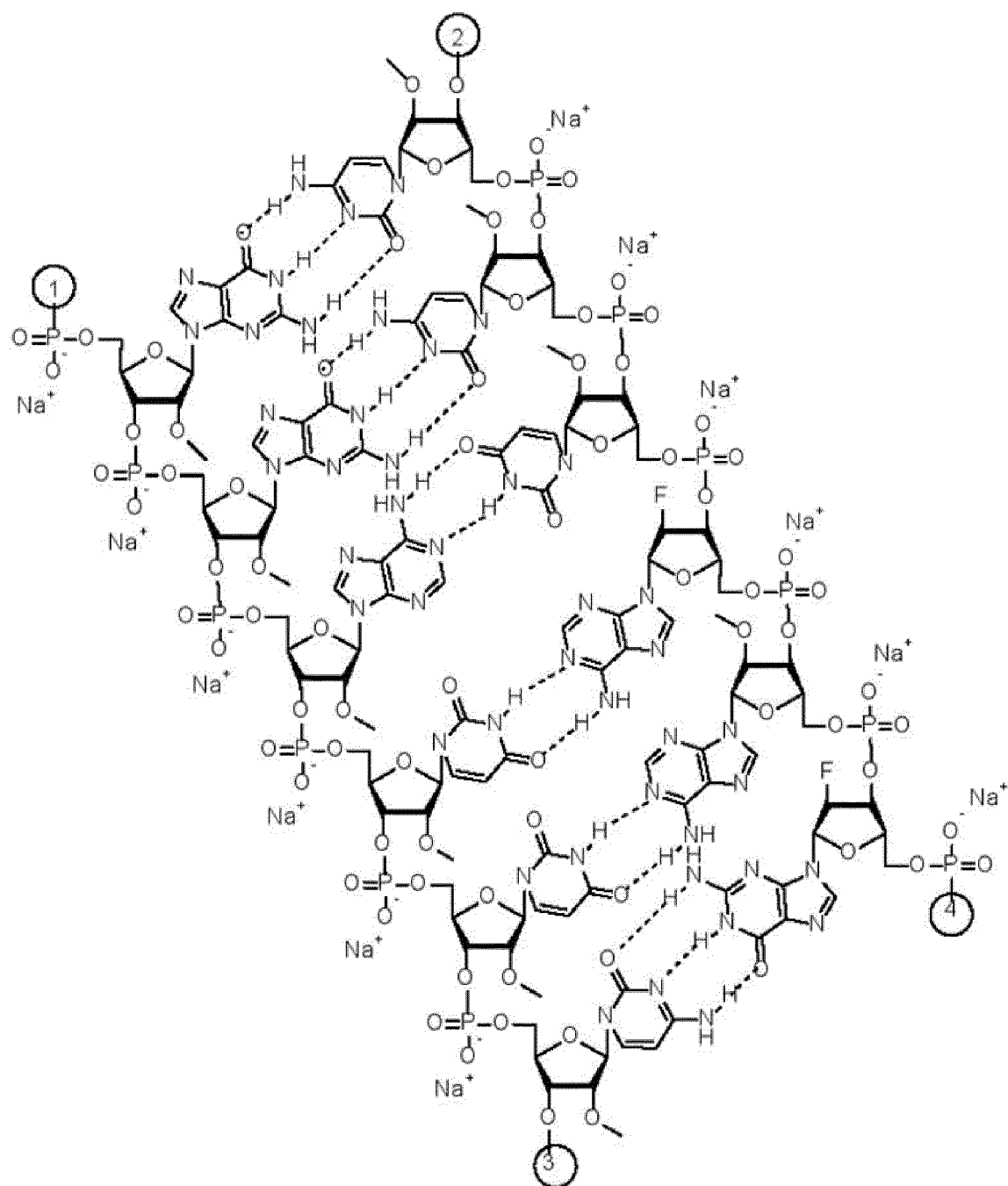
Фиг. 18Г



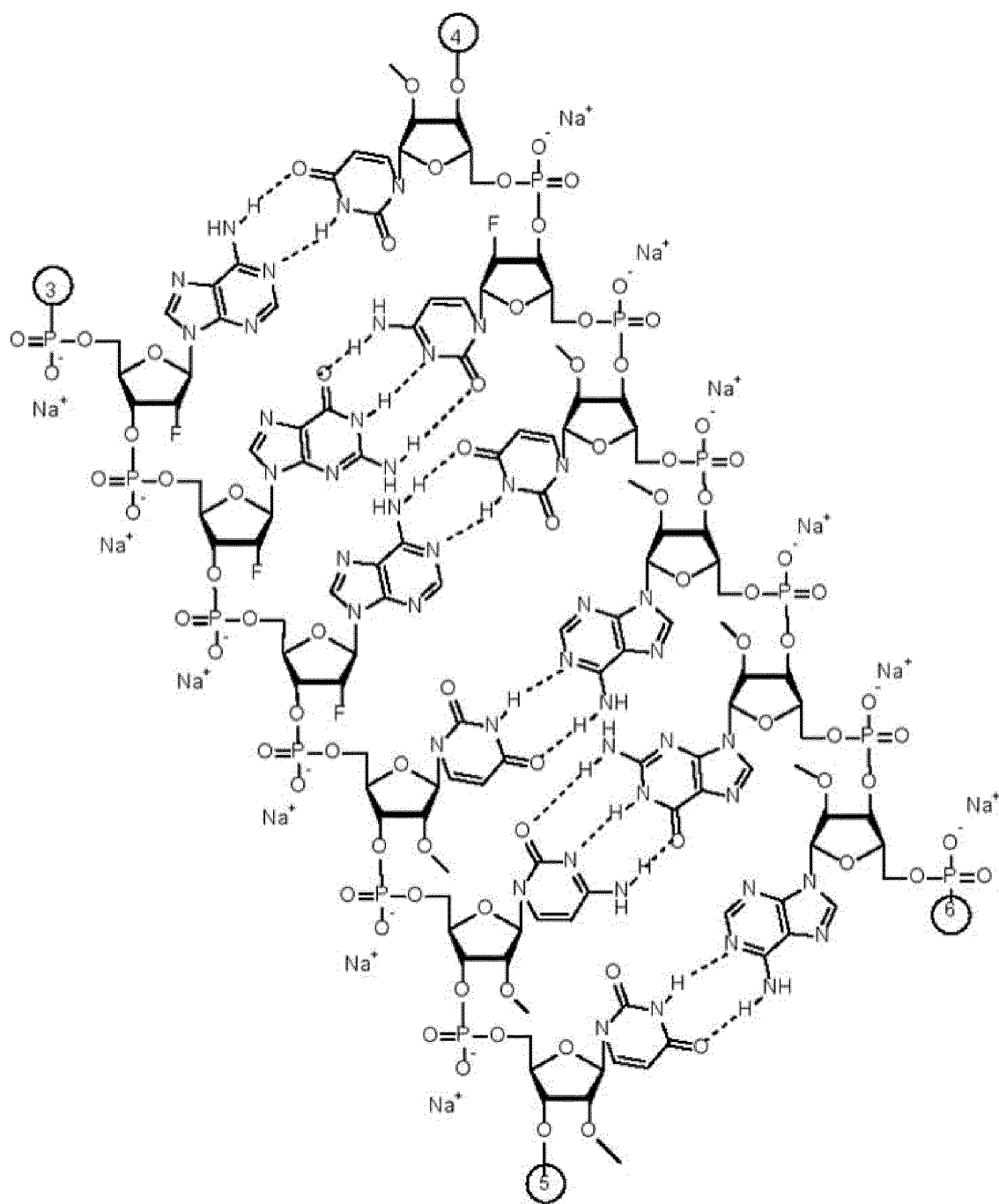
Фиг. 18Д



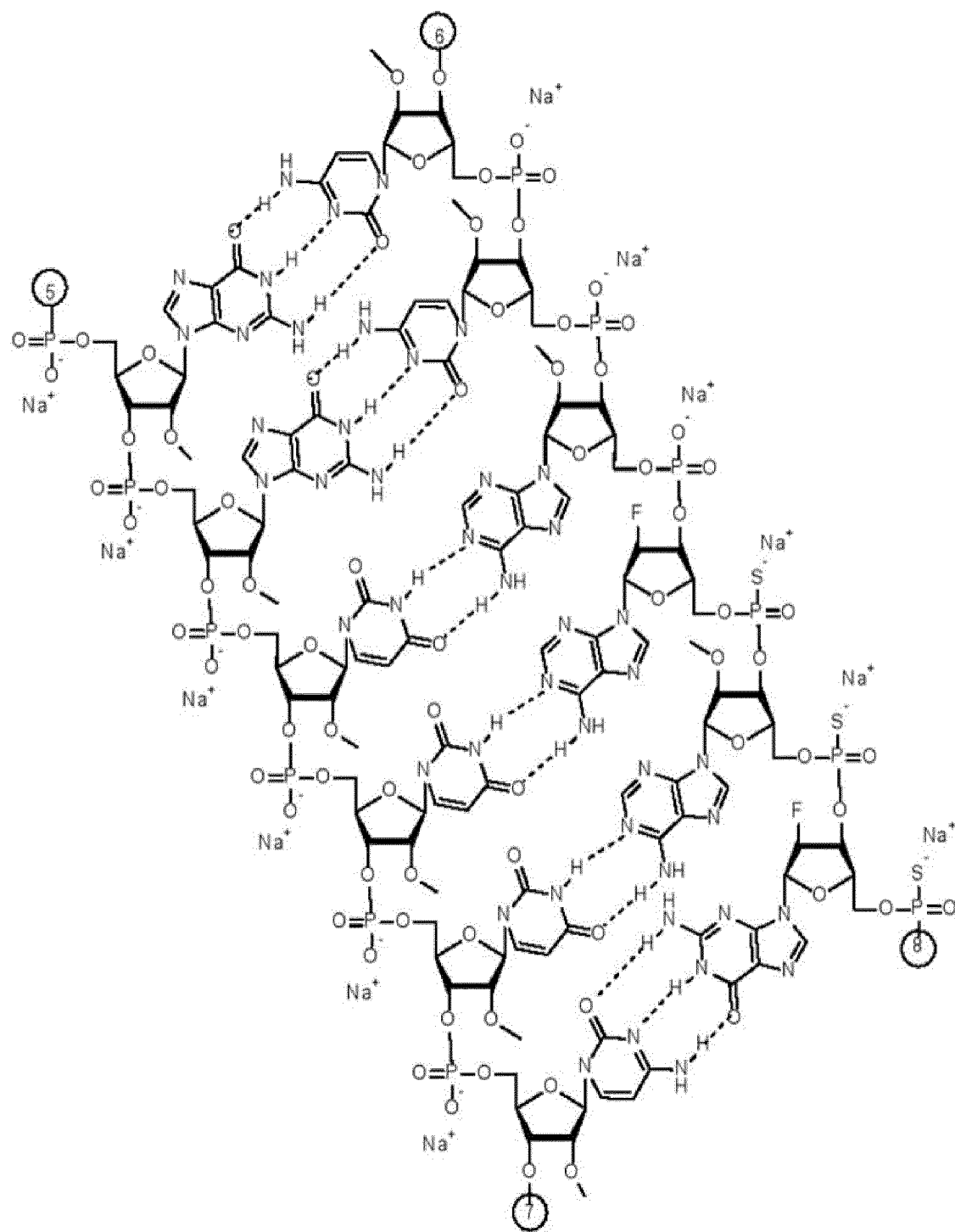
Фиг. 19А



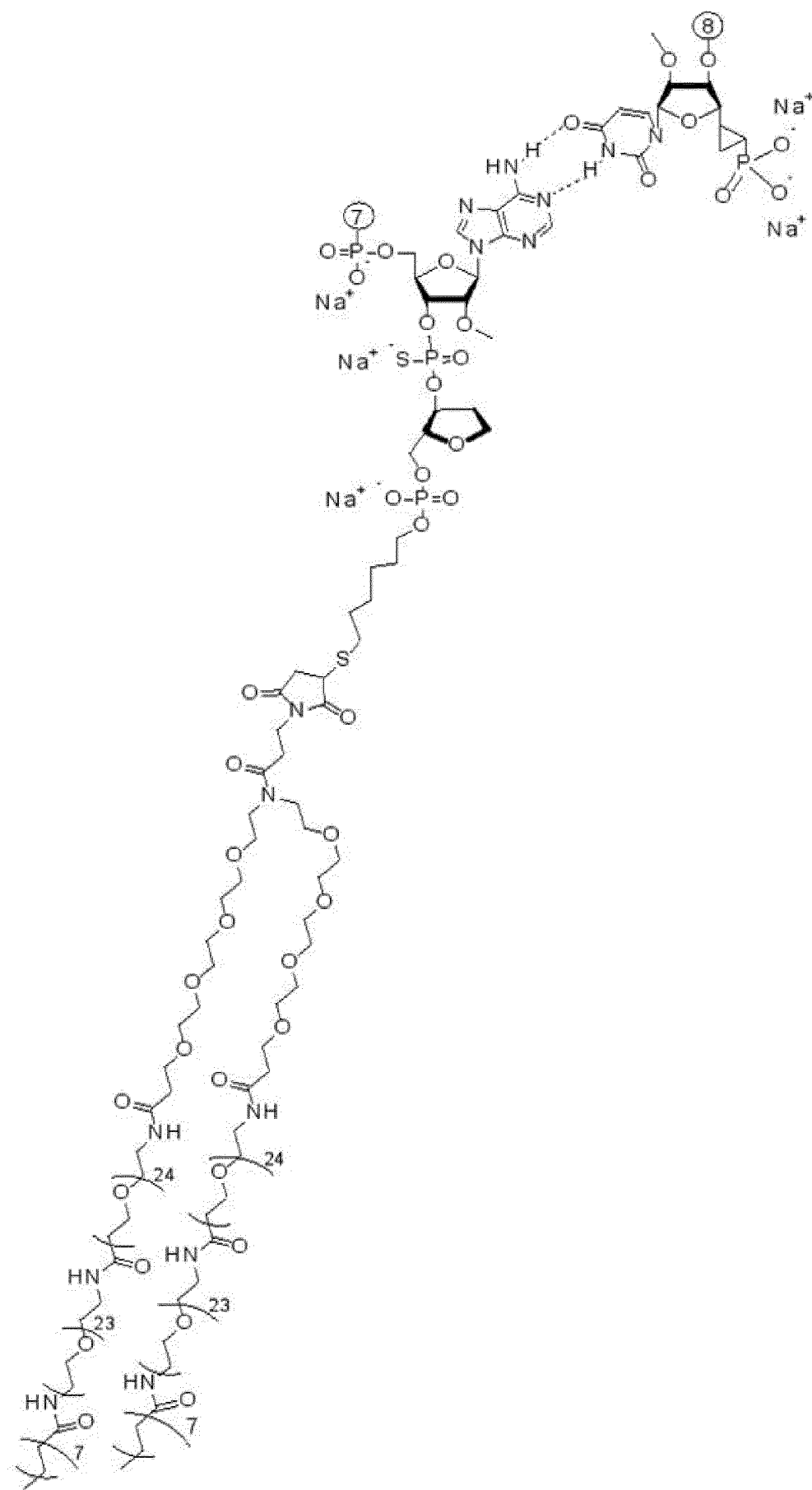
Фиг. 19Б



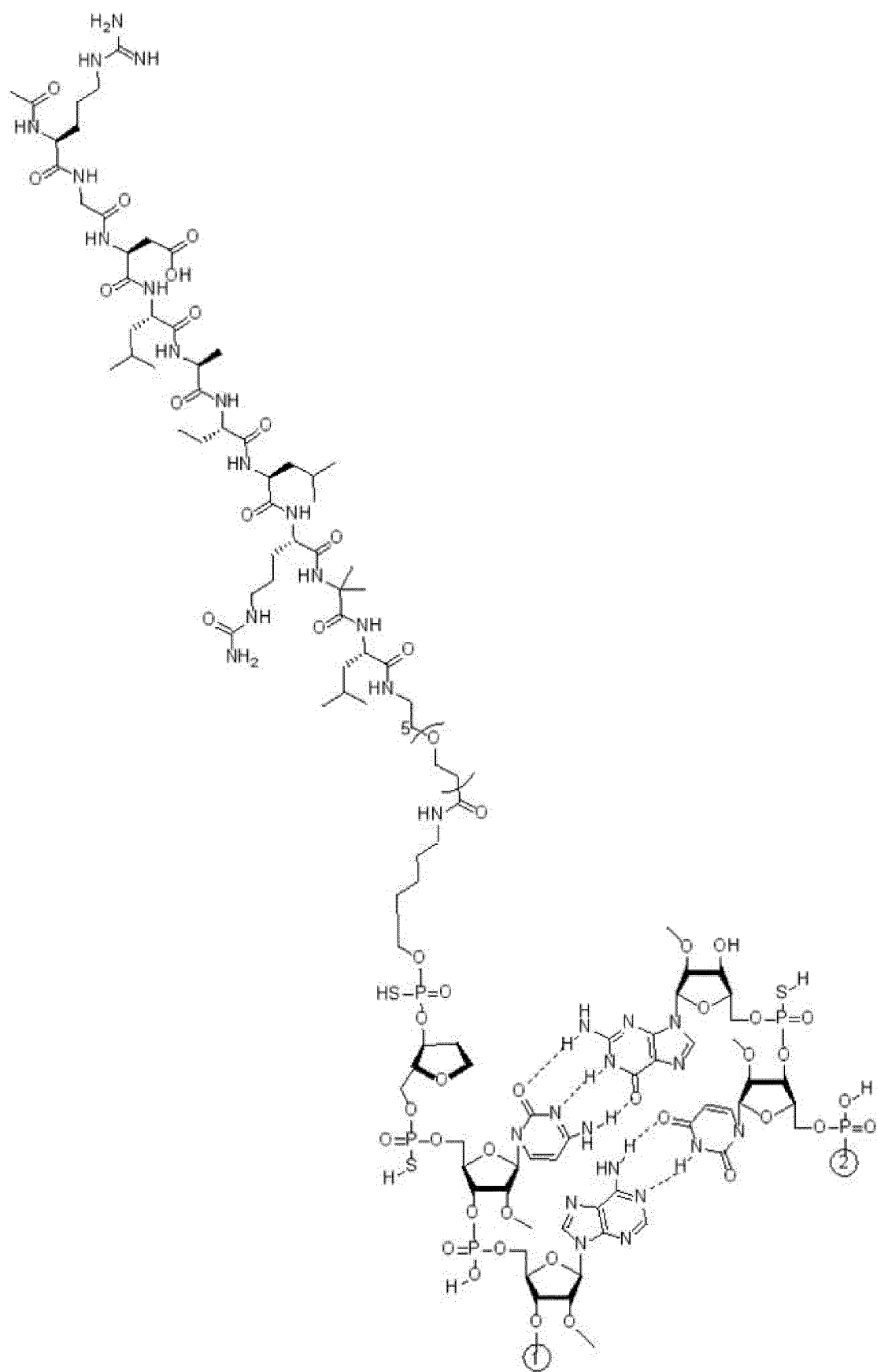
Фиг. 19В



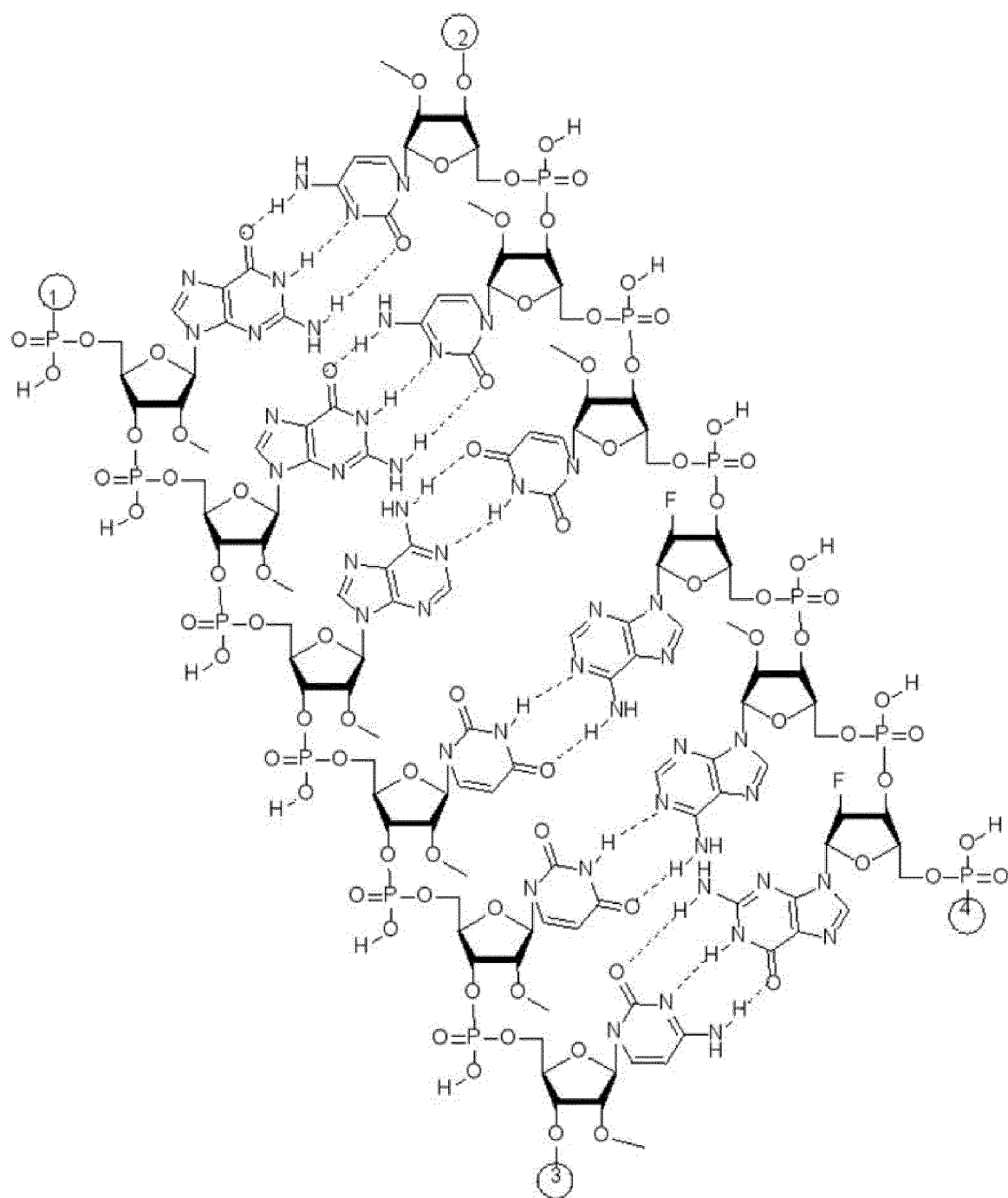
Фиг. 19Г



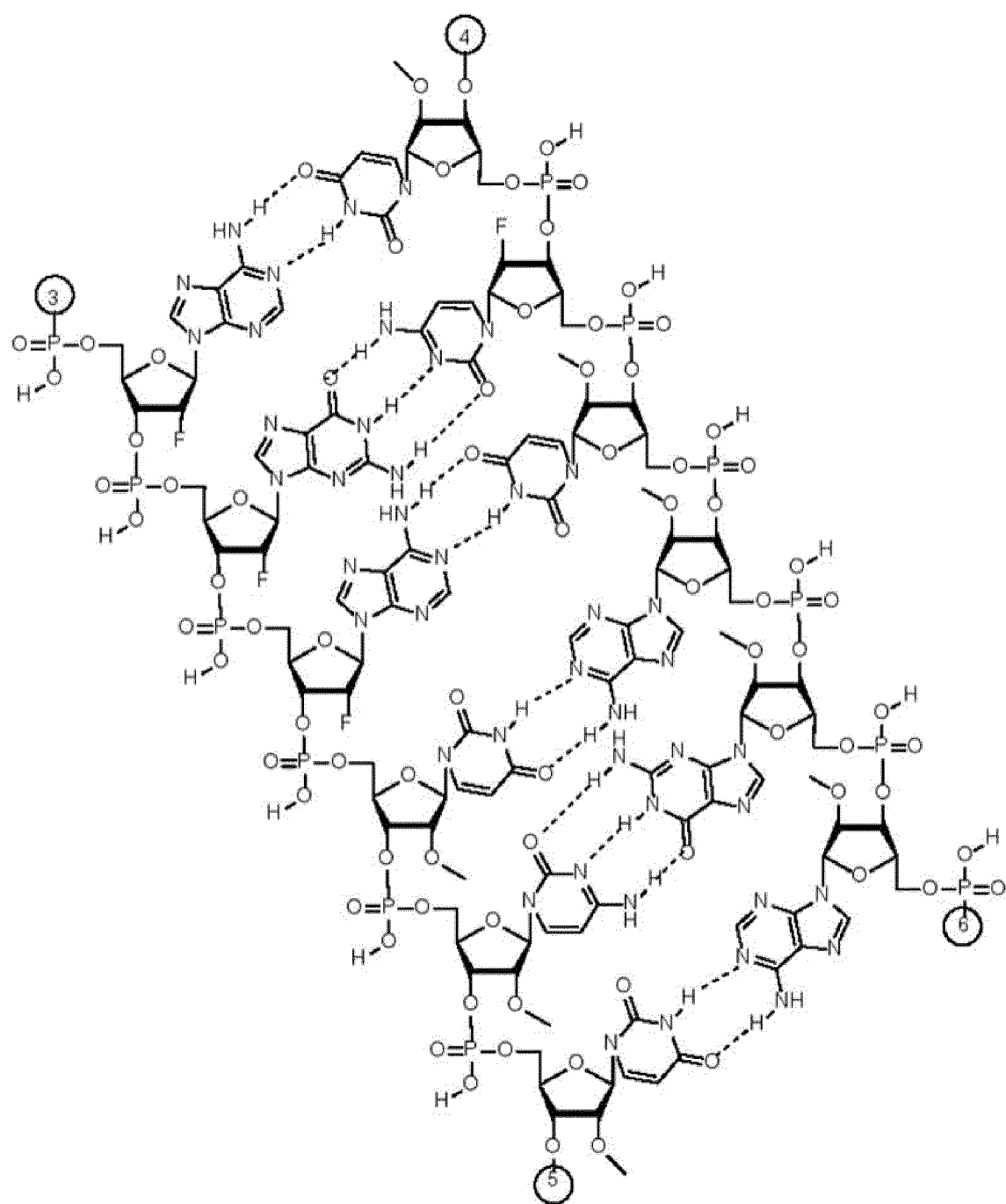
Фиг. 19Д



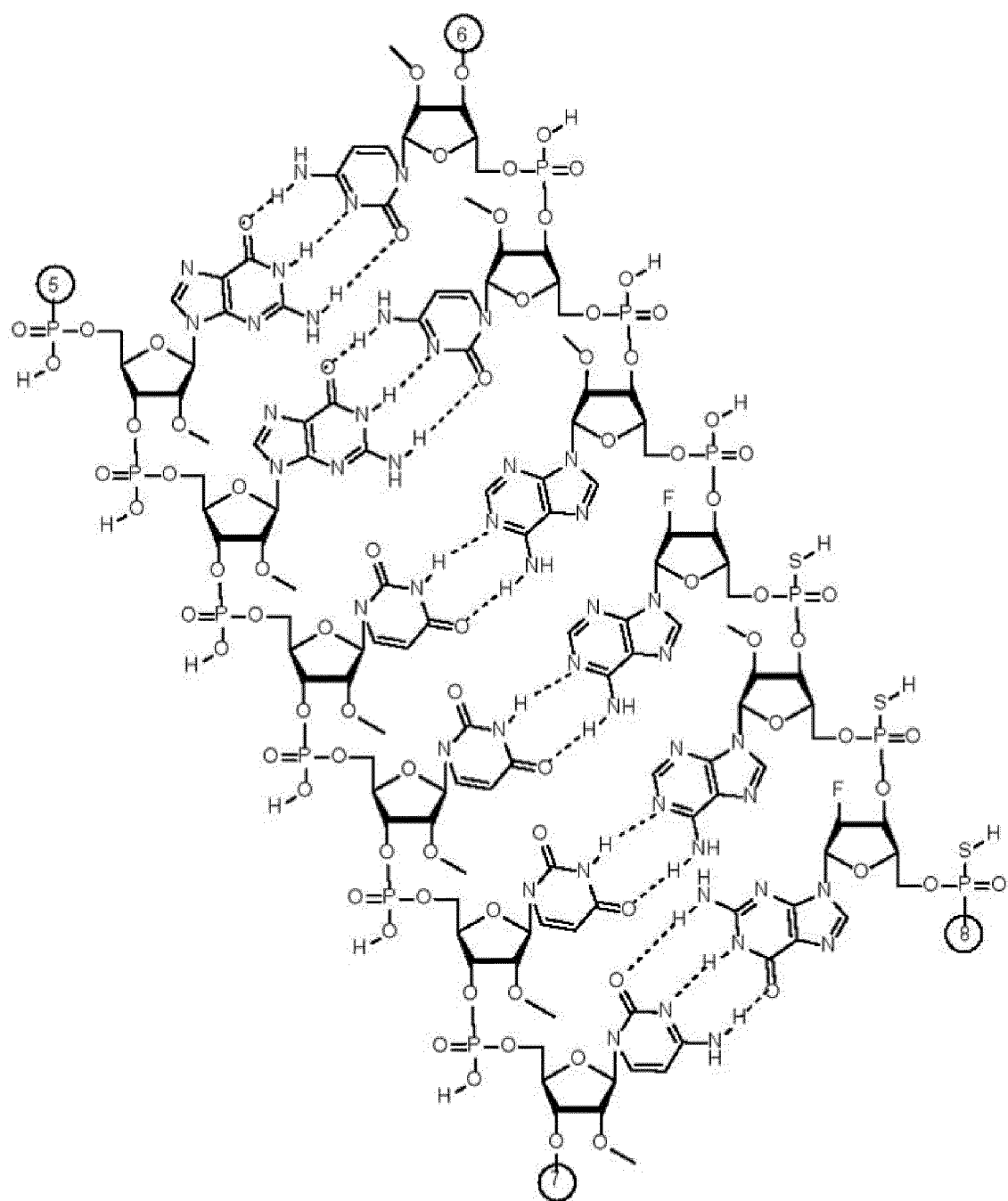
Фиг. 20А



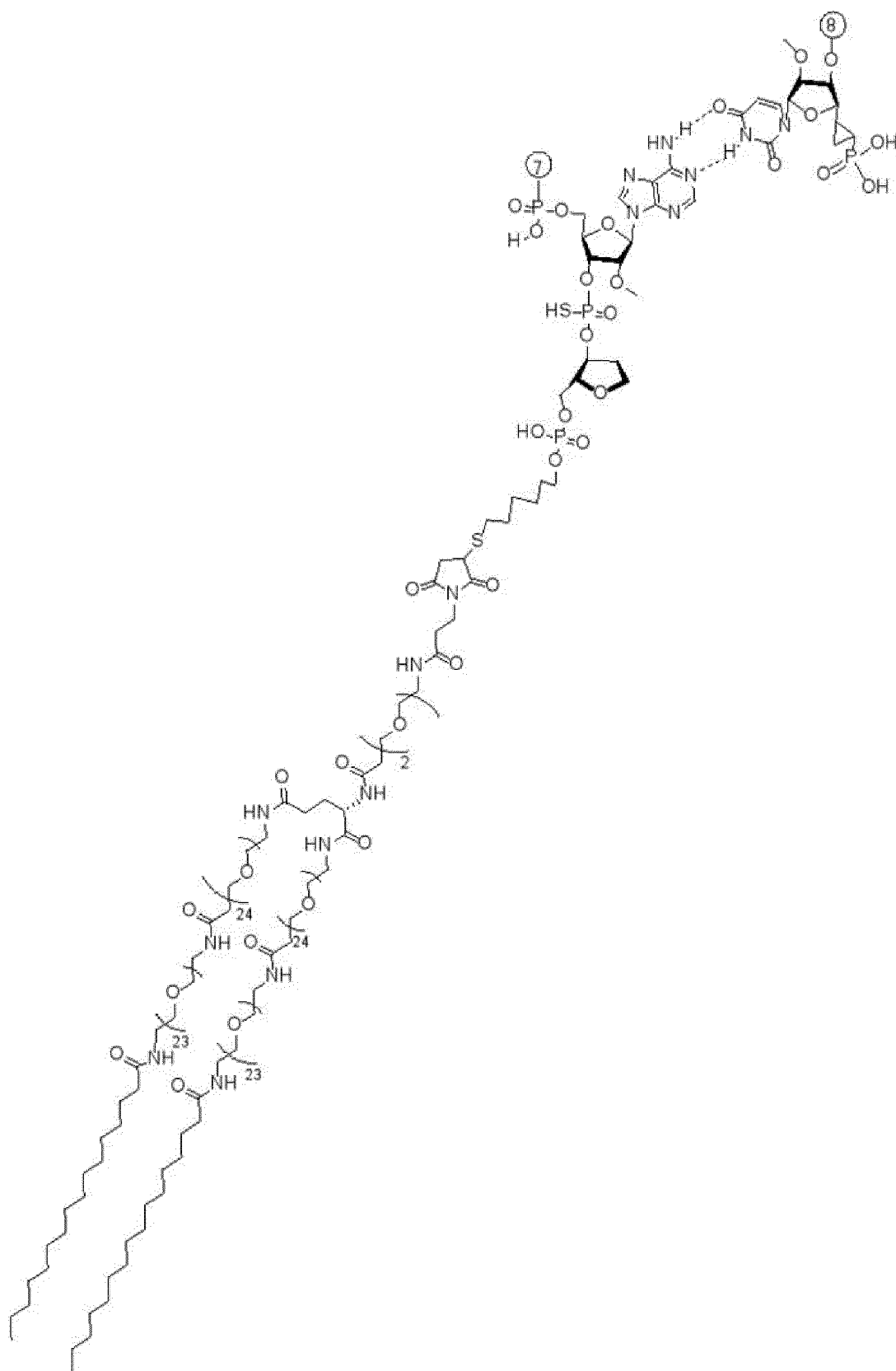
Фиг. 20Б



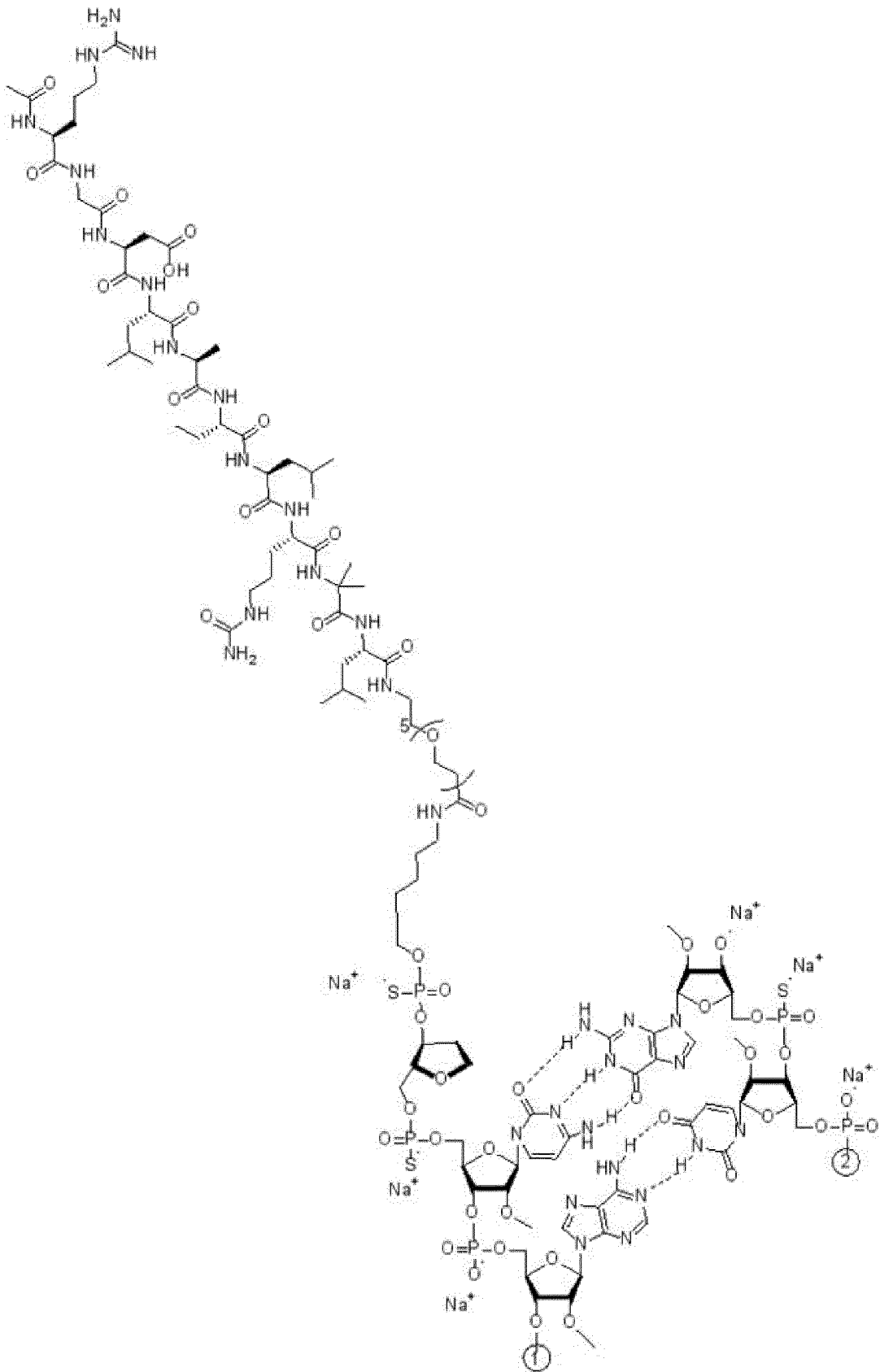
Фиг. 20В



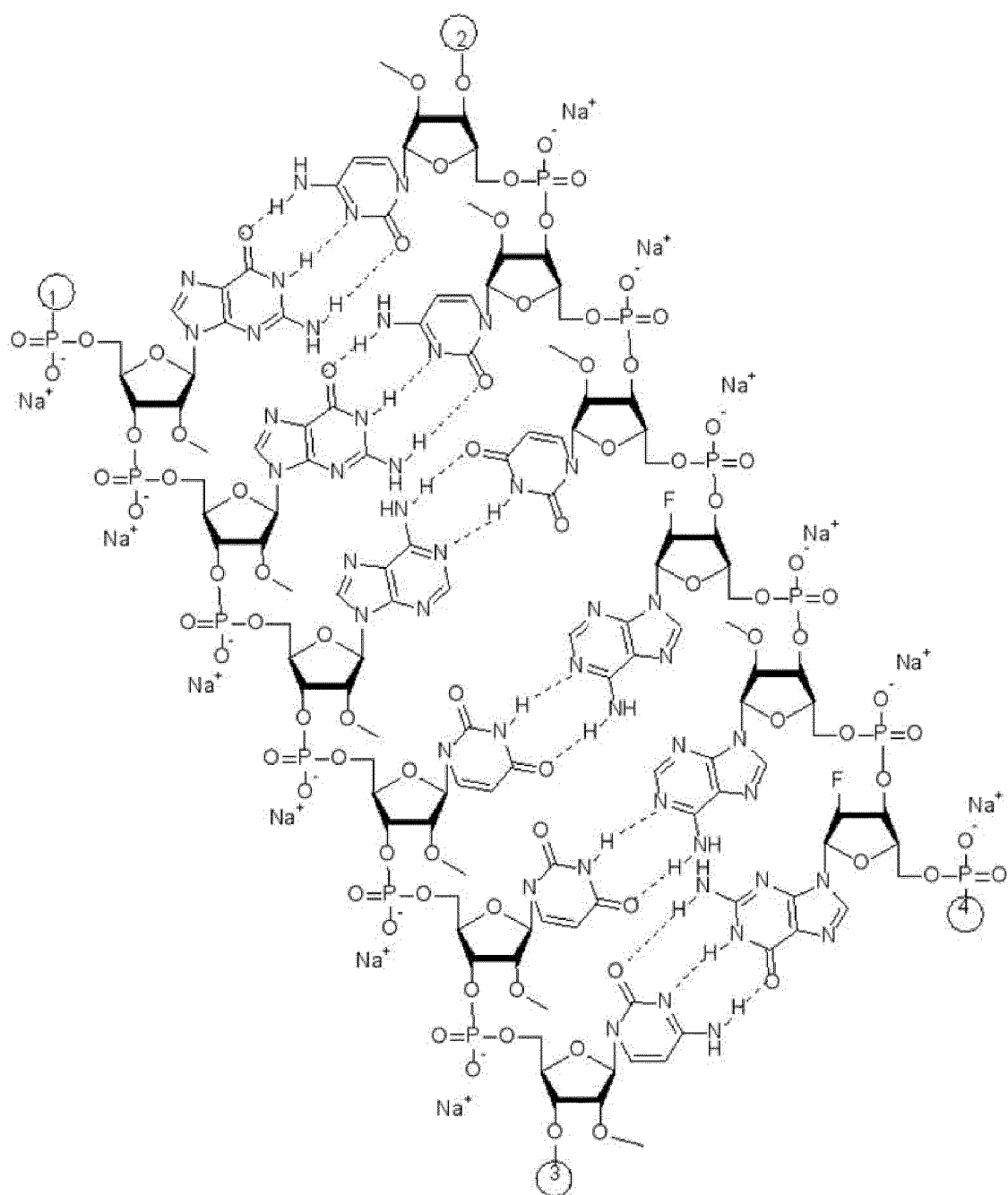
Фиг. 20Г



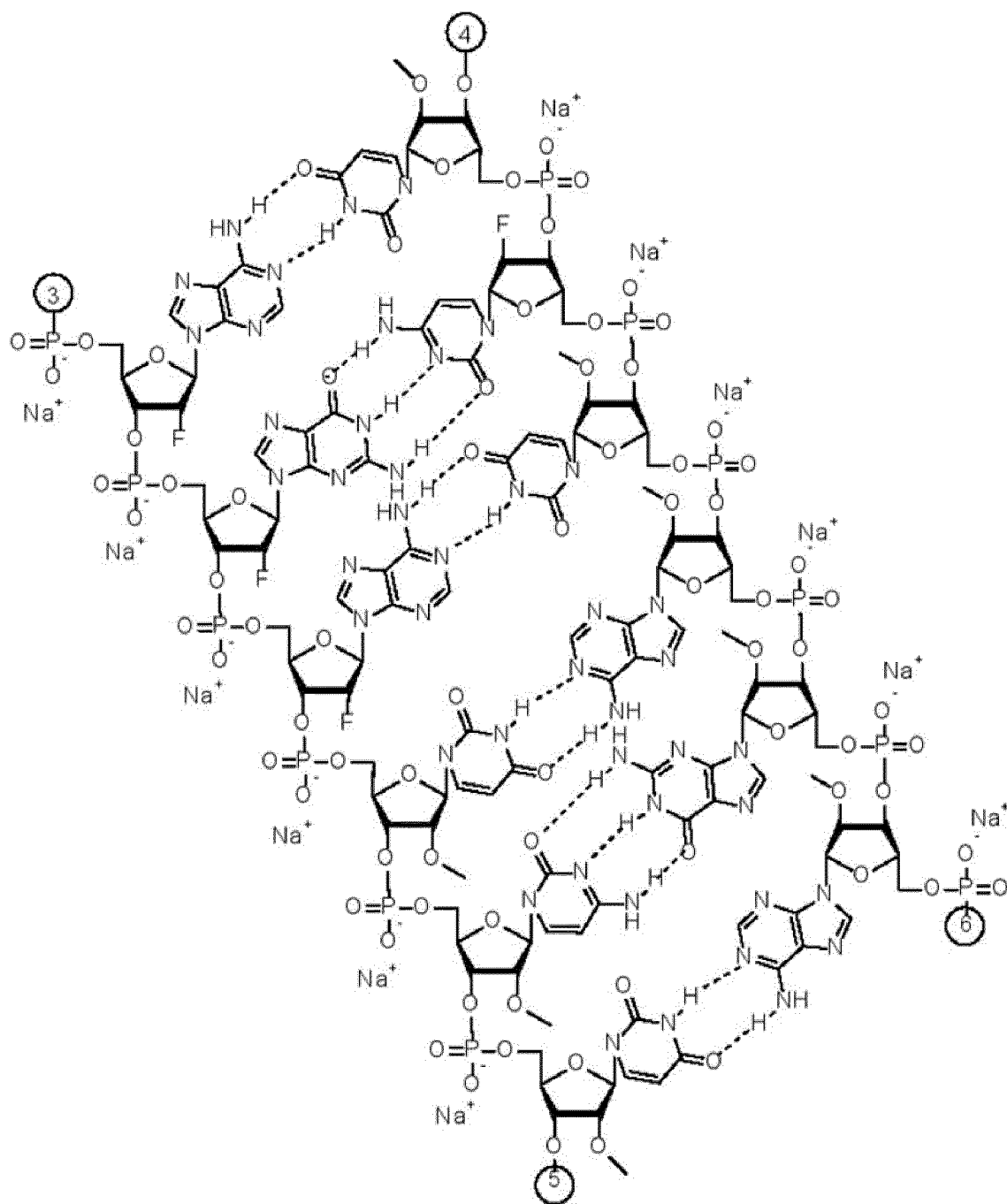
Фиг. 20Д



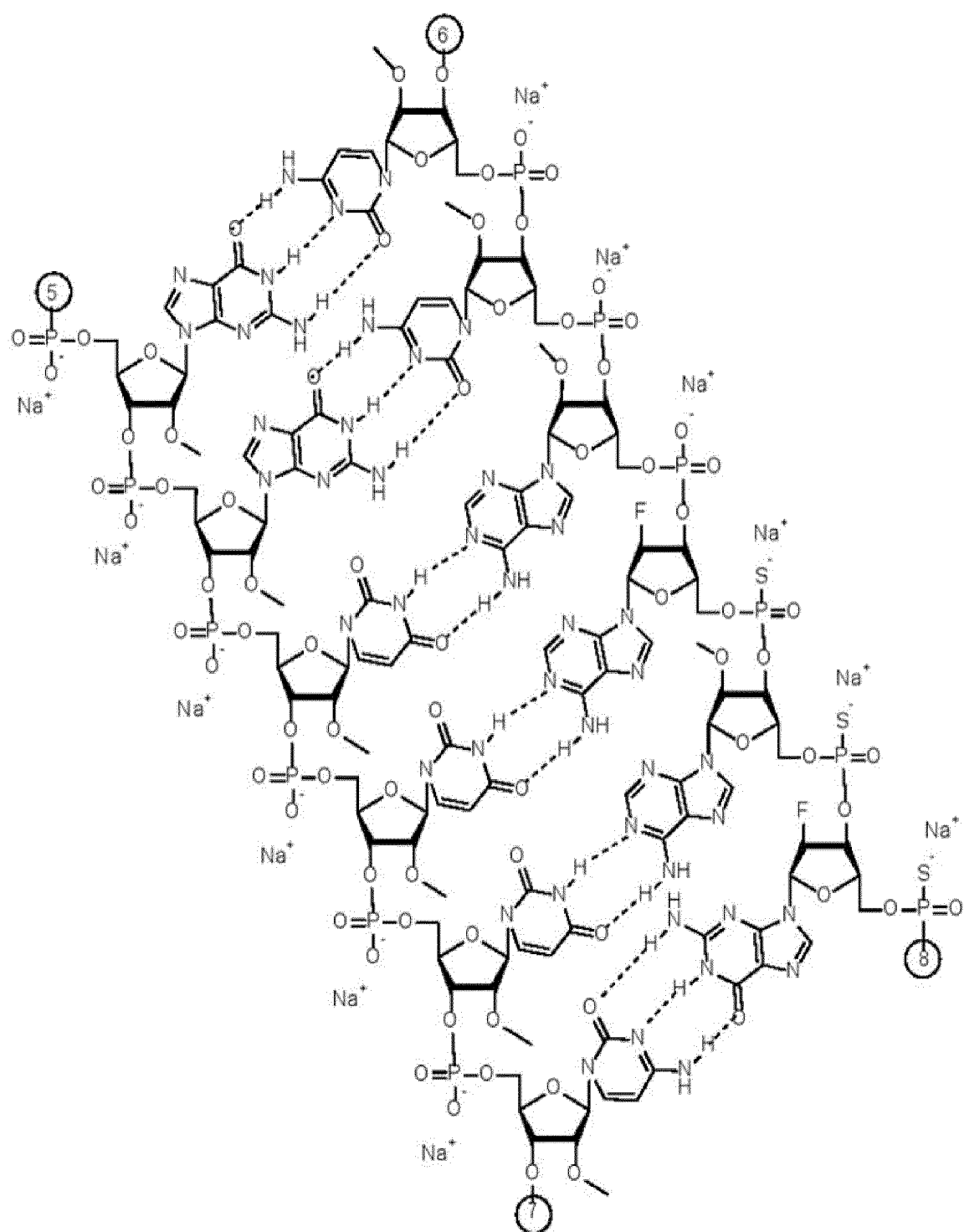
Фиг. 21А



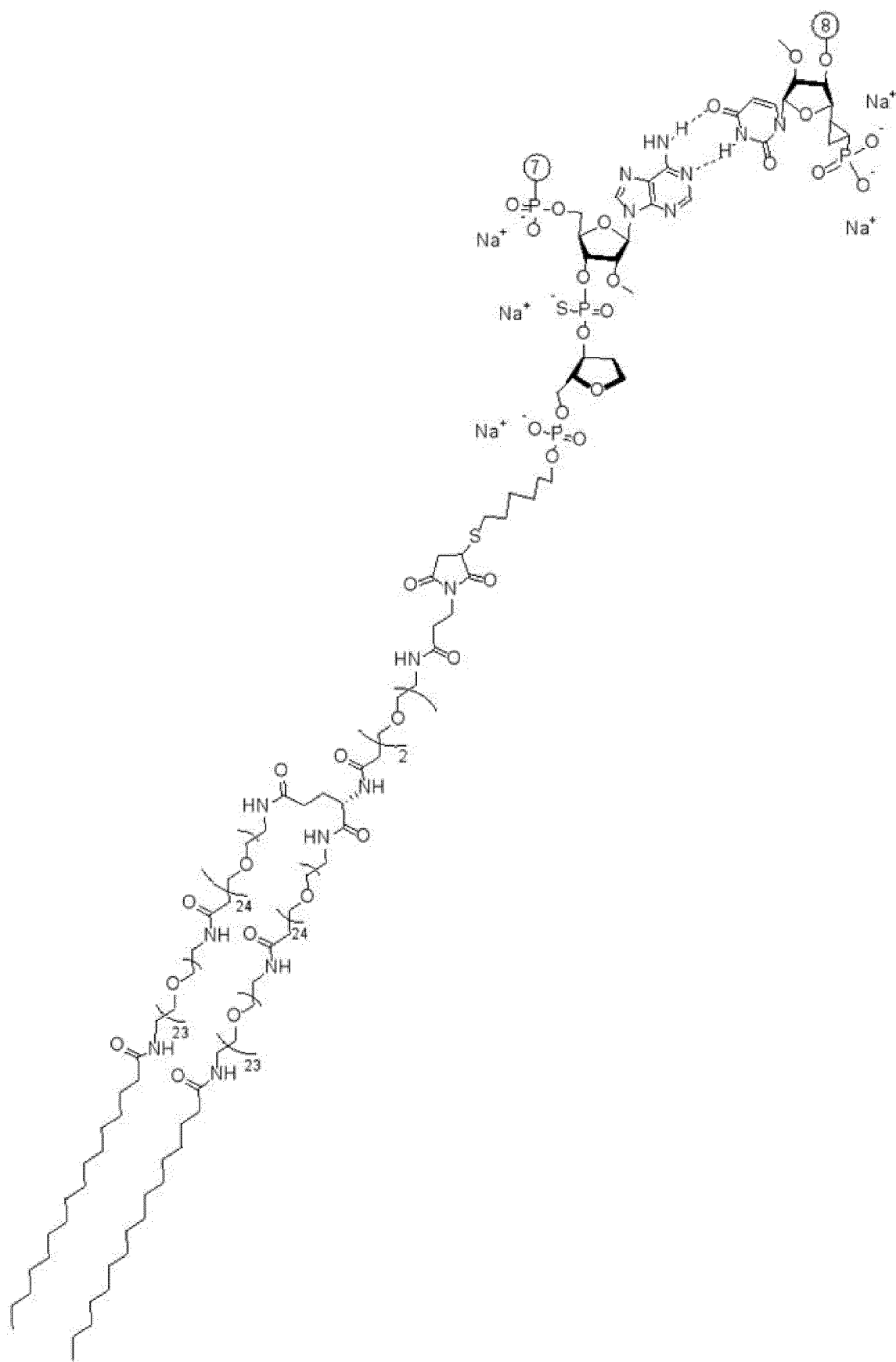
Фиг. 21Б



Фиг. 21В



Фиг. 21Г



Фиг. 21Д