

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392470** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.10.27

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.03.03

(54) **КОМПОЗИЦИИ иРНК ПРОТИВ АНГИОПОЭТИН-ПОДОБНОГО 3 (ANGPTL3) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **63/156,476; 63/308,668**

(32) **2021.03.04; 2022.02.10**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/018630**

(87) **WO 2022/187435 2022.09.09**

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

(72) Изобретатель:

**Бондюрант Лукас Д., Шлегель
Марк К., Зубер Джеффри, Вудс Лорен
Блэр, Чикеринг Тайлер (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к агентам РНКи, например агентам на основе двухцепочечной РНК (дцРНК), нацеленным на ген ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3). Настоящее изобретение также относится к способам применения таких агентов РНКи для ингибирования экспрессии гена ANGPTL3 и к способам предотвращения и лечения ANGPTL3-ассоциированного нарушения, например нарушения метаболизма липидов, такого как гиперлипидемия или гипертриглицеридемия.

A1

202392470

202392470

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579104EA/032

КОМПОЗИЦИИ ИРНК ПРОТИВ АНГИОПОЭТИН-ПОДОБНОГО 3 (ANGPTL3) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 63/156476, поданной 4 марта 2021 г., и предварительной заявке на патент США № 63/308668, поданной 10 февраля 2022 г. Полное содержание каждой из вышеупомянутых заявок включено в настоящий документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка включает перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и полное содержание которого включено посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 28 февраля 2022 г., названа 121301_15120_SL.txt и имеет размер 316668 байтов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Ангиопоэтин-подобный белок 3 (ANGPTL3) является членом семейства секретрируемых ангиопоэтин-подобных факторов, который регулирует метаболизм липидов и который преимущественно экспрессируется в печени (Koishi, R. *et al.*, (2002) *Nat. Genet.* 30(2):151-157). ANGPTL3 дуально ингибирует каталитическую активность липопротеинлипазы (LPL), которая катализирует гидролиз триглицеридов, и эндотелиальной липазы (EL), которая гидролизует фосфолипиды липопротеинов высокой плотности (HDL). У мышей KK/Snk с гиполипидемией, но с ожирением, снижение экспрессии ANGPTL3 защищает от гиперлипидемии и атеросклероза, способствуя клиренсу триглицеридов (Ando *et al.*, (2003) *J. Lipid Res.*, 44:1216-1223). Концентрации ANGPTL3 человека в плазме крови положительно коррелируют с уровнями холестерина HDL и фосфолипидов HDL в плазме крови (Shimamura *et al.*, (2007) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 27:366-372).

Нарушения метаболизма липидов могут приводить к повышенным уровням липидов в сыворотке крови, таких как триглицериды и/или холестерин. Повышенное содержание липидов в сыворотке крови в значительной степени связано с высоким артериальным давлением, сердечно-сосудистыми заболеваниями, диабетом и другими патологическими состояниями. Гипертриглицеридемия является примером нарушения метаболизма липидов, характеризующегося высокими уровнями триглицеридов в крови. Она связана с атеросклерозом, даже при отсутствии высоких уровней холестерина (гиперхолестеринемии). Если концентрации триглицеридов являются чрезмерными (т. е. более 1000 мг/дл или 12 ммоль/л), гипертриглицеридемия также может привести к панкреатиту. Гиперлипидемия является еще одним примером нарушения метаболизма липидов, характеризующегося повышенными уровнями любого одного или всех липидов и/или липопротеинов в крови. Современные методы лечения нарушений метаболизма липидов, включая соблюдение диеты, физические упражнения и лечение статинами и

другими лекарственными средствами, не всегда являются эффективными. Соответственно, в данной области техники существует потребность в альтернативных средствах лечения для субъектов, имеющих нарушения метаболизма липидов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему изобретению предложены композиции иРНК (интерферирующих РНК), которые влияют на опосредуемое РНК-индуцированным комплексом сайленсинга (RISC) расщепление транскриптов РНК гена, кодирующего ангиопоэтин-подобный белок 3 (ANGPTL3). Ген ANGPTL3 может находиться внутри клетки, например, клетки в организме субъекта, такого как субъект-человек. Согласно настоящему изобретению также предложены способы применения композиций иРНК согласно настоящему изобретению для ингибирования экспрессии гена ANGPTL3 и/или для лечения субъекта, который может получить пользу от ингибирования или снижения экспрессии гена ANGPTL3, например, субъекта, страдающего или предрасположенного к развитию нарушения метаболизма липидов, такого как субъект, страдающий или предрасположенный к развитию гиперлипидемии или гипертриглицеридемии.

Соответственно, согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии ангиопоэтин-подобного 3 (ANGPTL3) в клетке, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 1, 2 или 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2. Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК содержит по меньшей мере одну термически дестабилизирующую нуклеотидную модификацию, например, модификацию лишенным азотистого основания нуклеотидом; несовпадение с противоположным нуклеотидом в дуплексе; дестабилизирующую модификацию сахара, 2'-дезоксидификацию, ациклический нуклеотид, неблокированные нуклеиновые кислоты (UNA) и глицериновую нуклеиновую кислоту (GNA), например, антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну термически дестабилизирующую нуклеотидную модификацию.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии ангиопоэтин-подобного 3 (ANGPTL3) в клетке, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит область комплементарности мРНК, кодирующей ANGPTL3, и при этом указанная область комплементарности содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных

нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 2-3 и 7-8.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии ангиопэтин-подобного 3 (ANGPTL3) в клетке, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 58-80, 73-102, 73-124, 80-114, 91-113, 92-114, 291-320, 291-342, 307-336, 540-567, 540-589 и 545-577 SEQ ID NO: 1, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии ангиопэтин-подобного 3 (ANGPTL3) в клетке, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 58-80, 80-102; 84-106; 87-109; 91-113; 92-114; 186-208; 307-329; 308-330; 310-332; 314-336; 545-567; 551-573; 553-575; 554-576; 555-577; 1133-1155; или 1140-1162 SEQ ID NO: 1, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии ангиопэтин-подобного 3 (ANGPTL3) в клетке, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 58-80, 91-113 или 92-114 SEQ ID NO: 1, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии

ангиопоэтин-подобного 3 (ANGPTL3) в клетке, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 58-80 SEQ ID NO: 1, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1331203.1; AD-1331206.1; AD-1331209.1; AD-1331212.1; AD-1331213.1; AD-1331329.1; AD-1331237.1; AD-1331238.1; AD-1331240.1; AD-1331244.1; AD-1331256.1; AD-1331262.1; AD-1331264.1; AD-1331265.1; AD-1331266.1; AD-1331316.1; AD-1331338.1; и AD-1479372.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1331203.1; AD-1331206.1; AD-1331209.1; AD-1331212.1; AD-1331213.1; AD-1331329.1; AD-1331240.1; AD-1331262.1; AD-1331264.1; AD-1331265.1 AD-1331266.1; и AD-1479372.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1331203.1; AD-1331206.1; AD-1331209.1; AD-1331212.1; AD-1331213.1; и AD-1479372.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1331212.1; AD-1331213.1; и AD-1479372.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от нуклеотидной последовательности антисмысловой цепи AD-1479372.

Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно одному варианту реализации по существу все нуклеотиды смысловой цепи; по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию; или по существу все нуклеотиды смысловой цепи и по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

Согласно одному варианту реализации все нуклеотиды смысловой цепи содержат модификацию; все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию; или все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситимидинового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, блокированного нуклеотида, неблокированного нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, ограниченного этилнуклеотида, нуклеотида без азотистого основания, 2'-амин-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидрокси-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата, термически дестабилизирующего нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA), нуклеотида, содержащего 2'-фосфат, и 2-О-(N-метилацетамид)-модифицированного нуклеотида; и их комбинаций.

Согласно одному варианту реализации модификации на нуклеотидах выбраны из группы, состоящей из LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтил, 2'-О-алкил, 2'-О-аллил, 2'-С-аллил, 2'-фтор, 2'-дезокси, 2'-гидрокси и гликоля; и их комбинаций.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA), например, Ggn, Cgn, Tgn или Agn, нуклеотида с 2' фосфатом, например, G2p, C2p, A2p или U2p, и винилфосфонатного нуклеотида; и их комбинаций.

Согласно другому варианту реализации по меньшей мере одна из модификаций на нуклеотидах представляет собой термически дестабилизирующую нуклеотидную модификацию.

Согласно одному варианту реализации термически дестабилизирующая нуклеотидная модификация выбрана из группы, состоящей из модификации лишенным азотистого основания нуклеотидом; несовпадения с противоположным нуклеотидом в дуплексе; и дестабилизирующей модификации сахара, 2'-дезоксифосфорилирования, ациклического нуклеотида, неблокированных нуклеиновых кислот (UNA) и глицериновой нуклеиновой кислоты (GNA).

Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный нуклеотид содержит короткую последовательность из 3'-концевых дезокситимидиновых нуклеотидов (dT).

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную межнуклеотидную связь. Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК содержит 6-8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей. Согласно одному варианту реализации фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной цепи. Необязательно указанная цепь представляет собой антисмысловую цепь. Согласно другому варианту реализации указанная цепь представляет собой смысловую цепь. В связанном варианте реализации фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи. Необязательно указанная цепь представляет собой антисмысловую цепь. Согласно другому варианту реализации указанная цепь представляет собой смысловую цепь. Согласно другому варианту реализации фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-конце, так и на 3'-конце одной цепи. Необязательно указанная цепь представляет собой антисмысловую цепь. Согласно другому варианту реализации указанная цепь представляет собой смысловую цепь.

Двухцепочечная область может иметь 19-30 нуклеотидных пар в длину; 19-25 нуклеотидных пар в длину; 19-23 нуклеотидные пары в длину; 23-27 нуклеотидных пар в длину; или 21-23 нуклеотидные пары в длину.

Согласно одному варианту реализации каждая цепь независимо представляет собой не более 30 нуклеотидов в длину.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь представляет собой 21 нуклеотид в длину и антисмысловая цепь представляет собой 23 нуклеотида в длину.

Область комплементарности может представлять собой по меньшей мере 17 нуклеотидов в длину; от 19 до 23 нуклеотидов в длину; или 19 нуклеотидов в длину.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере одна цепь содержит 3'-липкий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. Согласно другому варианту реализации по меньшей мере одна цепь содержит 3'-липкий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

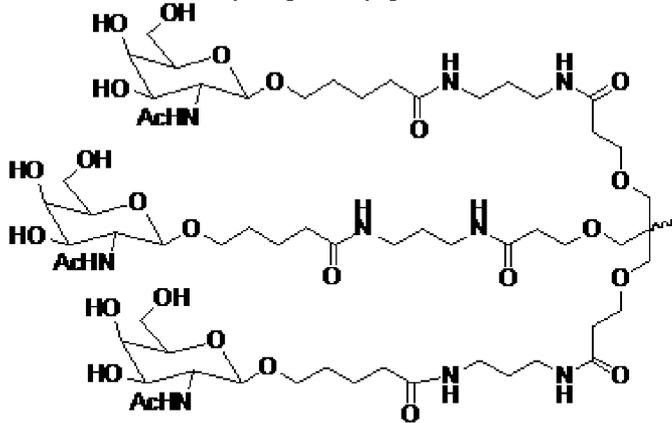
Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК дополнительно содержит лиганд.

Согласно одному варианту реализации лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи агента на основе дцРНК.

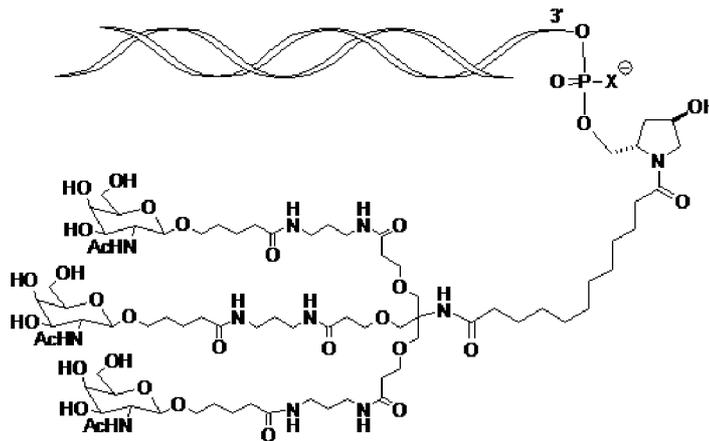
Согласно одному варианту реализации лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

Согласно одному варианту реализации лиганд представляет собой одно или более производных GalNAc, присоединенных посредством одновалентного, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

Согласно одному варианту реализации лиганд представляет собой



Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме



и где X представляет собой O или S.

Согласно одному варианту реализации X представляет собой O.

Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

Согласно одному варианту реализации фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной цепи, например, антисмысловой цепи или смысловой цепи.

Согласно другому варианту реализации фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи, например, антисмысловой цепи или смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-конце, так и на 3'-конце одной цепи. Согласно одному варианту реализации цепь представляет собой антисмысловую цепь.

Согласно одному варианту реализации пара оснований в положении 1 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса представляет собой пару оснований AU.

Согласно одному варианту реализации нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 4 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-*asasguccuUfCfUfuuuuauuguu*-3' (SEQ ID NO: 18), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 4 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-*asdAscadAudAaaaadGaAfggagcuusgsg*-3' (SEQ ID NO: 19), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; dA и dG представляют собой 2'-дезоксидА и G; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксид-2'-фтор (2'-F) С и U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

Согласно одному варианту реализации нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 3 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-*asasguccuUfCfUfuuuuauuguu*-3' (SEQ ID NO: 18), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 3 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-*asdAscadAudAaaaadGaAfggagcuusgsg*-3' (SEQ ID NO: 19), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; dA и dG представляют собой 2'-дезоксидА и G; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксид-2'-фтор (2'-F) С и U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

Согласно одному варианту реализации нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 2 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-*asasguccuUfCfUfuuuuauuguu*-3' (SEQ ID NO: 18), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 2 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-*asdAscadAudAaaaadGaAfggagcuusgsg*-3' (SEQ ID NO: 19), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; dA и dG представляют собой 2'-дезоксидА и G; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксид-2'-фтор (2'-F) С и U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

Согласно одному варианту реализации нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 1 основанием от нуклеотидной последовательности 5'-*asasguccuUfCfUfuuuuauuguu*-3' (SEQ ID NO: 18), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 1 основанием от нуклеотидной последовательности 5'-*asdAscadAudAaaaadGaAfggagcuusgsg*-3' (SEQ ID NO: 19), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; dA и dG представляют собой 2'-дезоксидА и G; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксид-2'-фтор (2'-F) С и U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

Согласно одному варианту реализации нуклеотидная последовательность смысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-*asasguccuUfCfUfuuuuauuguu*-3' (SEQ ID NO: 18), и нуклеотидная последовательность

антисмысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asdAscadAudAaaaadGaAfggagcuusgsg-3' (SEQ ID NO: 19), где а, г, с и и представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; dА и dG представляют собой 2'-дезоксидА и G; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксид-2'-фтор (2'-F) С и U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

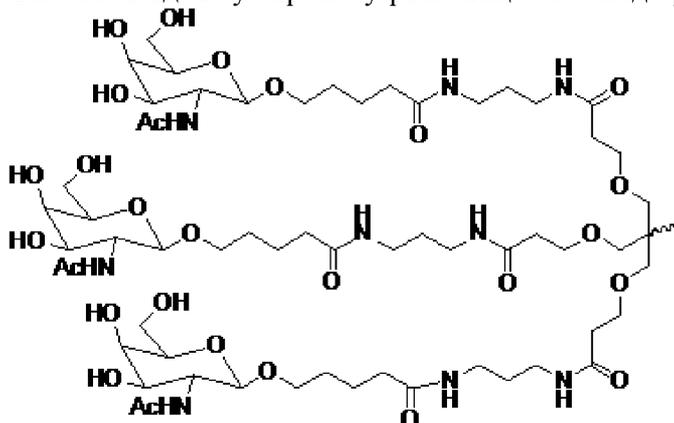
Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК дополнительно содержит лиганд.

Согласно одному варианту реализации лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи агента на основе дцРНК.

Согласно одному варианту реализации лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

Согласно одному варианту реализации лиганд представляет собой одно или более производных GalNAc, присоединенных посредством одновалентного, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

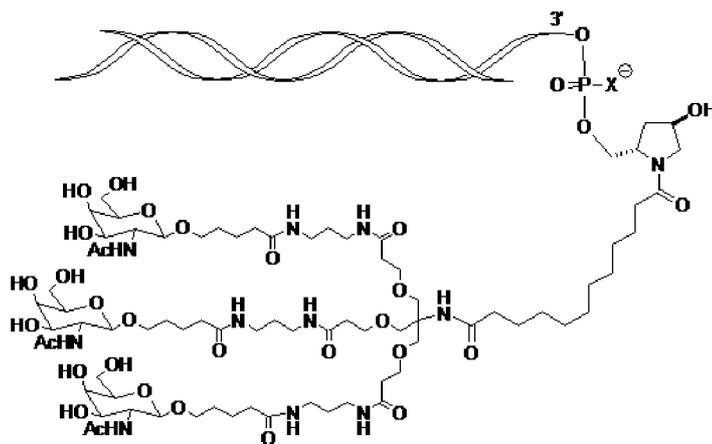
Согласно одному варианту реализации лиганд представляет собой



Согласно одному варианту реализации нуклеотидная последовательность смысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asascgucsuUfCfUfuuuuuuuuuuL96-3' (SEQ ID NO: 20), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asdAscadAudAaaaadGaAfggagcuusgsg-3' (SEQ ID NO: 19), где а, г, с и и представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; dА и dG представляют собой 2'-дезоксидА и G; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксид-2'-фтор (2'-F) С и U; s представляет собой фосфотиоатную связь, и L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканол]-4-гидроксипролин.

Согласно одному варианту реализации нуклеотидная последовательность смысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asascgucsuUfCfUfuuuuuuuuuu-3' (SEQ ID NO: 18), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asdAscadAudAaaaadGaAfggagcuusgsg-3' (SEQ ID NO: 19), где а, г, с и и представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; dА и dG представляют собой 2'-дезоксидА и G; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксид-2'-фтор (2'-F) С и U; s представляет собой фосфотиоатную

связь, и где лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи, как показано на следующей схеме



, где X представляет собой O.

Согласно одному варианту реализации нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 4 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-asascgucCfuUfCfUfuuuuauuguu-3' (SEQ ID NO: 21), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 4 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-asAfscaaUfaaaaagaAfgGfagcuusasa-3' (SEQ ID NO: 22); или согласно которому нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 4 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-asgscuccUfuCfUfUfuuuuauuguuu-3' (SEQ ID NO: 23), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 4 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-asAfsacaAfuaaaaagAfaGfgagcususa-3' (SEQ ID NO: 24), где a, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-OMe) A, G, C и U; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксидезокси-2'-фтор (2'-F) C и U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

Согласно одному варианту реализации нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 3 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-asascgucCfuUfCfUfuuuuauuguu-3' (SEQ ID NO: 21), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 3 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-asAfscaaUfaaaaagaAfgGfagcuusasa-3' (SEQ ID NO: 22); или согласно которому нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 3 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-asgscuccUfuCfUfUfuuuuauuguuu-3' (SEQ ID NO: 23), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 3 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-asAfsacaAfuaaaaagAfaGfgagcususa-3' (SEQ ID NO: 24), где a, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-OMe) A, G, C и U; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксидезокси-2'-фтор (2'-F) C и U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

Согласно одному варианту реализации нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 2 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-asascgucCfuUfCfUfuuuuauuguu-3' (SEQ ID NO: 21), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 2 основаниями от

нуклеотидной последовательности 5'-asAfscaaUfaaaaagaAfgGfagcuusasa-3' (SEQ ID NO: 22); или согласно которому нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 2 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-asgscuccUfuCfUfUfuuuuuuguuu-3' (SEQ ID NO: 23), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 2 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-asAfsacaAfuaaaaagAfaGfgagcususa-3' (SEQ ID NO: 24), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксидезокси-2'-фтор (2'-F) С и U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

Согласно одному варианту реализации нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 1 основанием от нуклеотидной последовательности 5'-asagcuccCfuUfCfUfuuuuuuuguuu-3' (SEQ ID NO: 21), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 1 основанием от нуклеотидной последовательности 5'-asAfscaaUfaaaaagaAfgGfagcuusasa-3' (SEQ ID NO: 22); или согласно которому нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 1 основанием от нуклеотидной последовательности 5'-asgscuccUfuCfUfUfuuuuuuguuu-3' (SEQ ID NO: 23), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 1 основанием от нуклеотидной последовательности 5'-asAfsacaAfuaaaaagAfaGfgagcususa-3' (SEQ ID NO: 24), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксидезокси-2'-фтор (2'-F) С и U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

Согласно одному варианту реализации нуклеотидная последовательность смысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asagcuccCfuUfCfUfuuuuuuuguuu-3' (SEQ ID NO: 21), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asAfscaaUfaaaaagaAfgGfagcuusasa-3' (SEQ ID NO: 22); или согласно которому нуклеотидная последовательность смысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asgscuccUfuCfUfUfuuuuuuguuu-3' (SEQ ID NO: 23), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asAfsacaAfuaaaaagAfaGfgagcususa-3' (SEQ ID NO: 24), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксидезокси-2'-фтор (2'-F) С и U; s представляет собой фосфотиоатную связь.

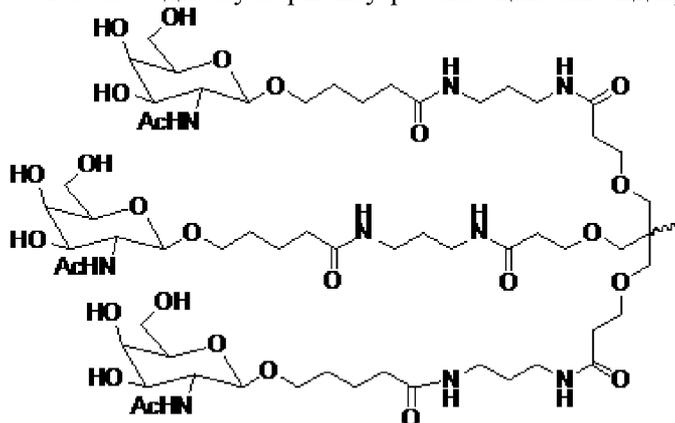
Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК дополнительно содержит лиганд.

Согласно одному варианту реализации лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи агента на основе дцРНК.

Согласно одному варианту реализации лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

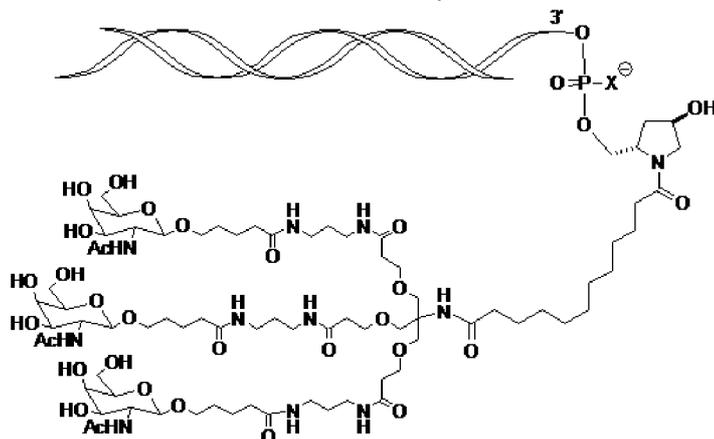
Согласно одному варианту реализации лиганд представляет собой одно или более производных GalNAc, присоединенных посредством одновалентного, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

Согласно одному варианту реализации лиганд представляет собой



Согласно одному варианту реализации нуклеотидная последовательность смысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asasgcucCfuUfCfUfuuuuuuuuuL96-3' (SEQ ID NO: 25), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asAfscaaUfaaaaagaAfgGfagcuusasa-3' (SEQ ID NO: 22); или согласно которому нуклеотидная последовательность смысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asgscuccUfuCfUfUfuuuuuuuuuL96-3' (SEQ ID NO: 281), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asAfsacaAfuaaaaagAfaGfgagcususa-3' (SEQ ID NO: 24), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-О-Ме) А, G, С и U; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксидезокси-2'-фтор (2'-F) С и U; s представляет собой фосфотиоатную связь, и L96 представляет собой N-[трис(ГалНАс-алкил)-амидодеканол]-4-гидроксипролин.

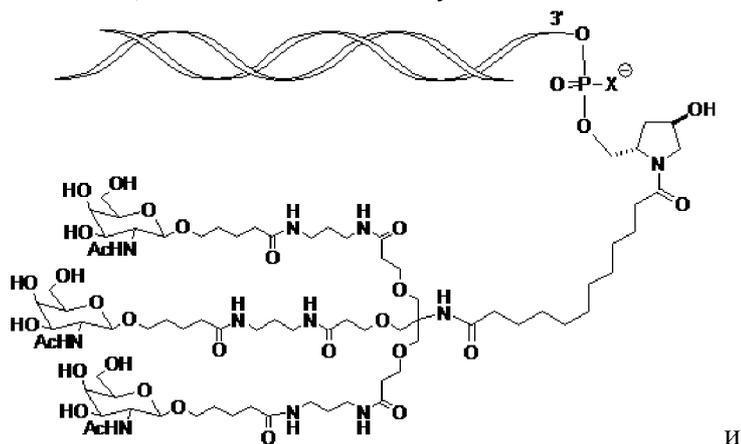
Согласно одному варианту реализации нуклеотидная последовательность смысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asasgcucCfuUfCfUfuuuuuuuuu-3' (SEQ ID NO: 21), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asAfscaaUfaaaaagaAfgGfagcuusasa-3' (SEQ ID NO: 22); где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-О-Ме) А, G, С и U; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксидезокси-2'-фтор (2'-F) С и U; s представляет собой фосфотиоатную связь, и где лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи, как показано на следующей схеме



и

где X представляет собой O.

Согласно одному варианту реализации нуклеотидная последовательность смысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asgscuccUfuCfUfUfuuuuuuuuu-3' (SEQ ID NO: 23), и нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asAfsacaAfuaaaaagAfaGfgagcusa-3 (SEQ ID NO: 24); где а, г, с и u представляют собой 2'-O-метил (2'-OMe) A, G, C и U; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксидезокси-2'-фтор (2'-F) C и U; s представляет собой фосфотиоатную связь и где лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи, как показано на следующей схеме



где X представляет собой O.

Согласно настоящему изобретению также предложены клетки, содержащие любой из агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, и фармацевтические композиции, содержащие любой из агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может включать агент на основе дцРНК в незабуференном растворе, например, физиологическом растворе или воде, или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может включать агент на основе дцРНК в буферном растворе, например, буферном растворе, содержащем ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат, или любую их комбинацию; или фосфатно-солевым буферном растворе (ФСБ).

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен способ ингибирования экспрессии гена ангиопозтин-подобного белка 3 (ANGPTL3) в клетке. Способ включает приведение клетки в контакт с любой из дцРНК согласно настоящему изобретению или любой из фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению, что ингибирует экспрессию гена ANGPTL3 в клетке.

Согласно одному варианту реализации клетка находится в организме субъекта, например, субъекта-человека, например, субъекта, имеющего нарушение, ассоциированное с ангиопозтин-подобным 3 (ANGPTL3), такое как нарушение метаболизма липидов. Согласно определенным вариантам реализации нарушение метаболизма липидов представляет собой гиперлипидемию или гипертриглицеридемию.

Согласно определенным вариантам реализации экспрессия ANGPTL3 ингибируется по меньшей мере примерно на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%. Согласно одному варианту реализации ингибирование экспрессии ANGPTL3 уменьшает уровень белка ANGPTL3 в сыворотке крови субъекта по меньшей мере на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть получена польза от снижения экспрессии ангиопозтин-подобного 3 (ANGPTL3). Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из дцРНК согласно настоящему изобретению или любой из фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению, что обеспечивает лечение субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть получена польза от снижения экспрессии ANGPTL3.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть получена польза от снижения экспрессии ангиопозтин-подобного 3 (ANGPTL3). Способ включает введение субъекту профилактически эффективного количества любой из дцРНК согласно настоящему изобретению или любой из фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению, что предотвращает по меньшей мере один симптом у субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть получена польза от снижения экспрессии ANGPTL3.

Согласно определенным вариантам реализации нарушение представляет собой нарушение, ассоциированное с ангиопозтин-подобным 3 (ANGPTL3), например, нарушение метаболизма липидов. Согласно определенным вариантам реализации нарушение метаболизма липидов представляет собой гиперлипидемию или гипертриглицеридемию. Согласно определенным вариантам реализации введение дцРНК субъекту вызывает уменьшение уровня одного или более липидов сыворотки крови и/или уменьшение накопления белка ANGPTL3.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения также предложены способы ингибирования экспрессии ANGPTL3 у субъекта. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из дцРНК, предложенных в настоящем документе, что ингибирует экспрессию ANGPTL3 у субъекта.

Согласно одному варианту реализации субъект представляет собой человека.

Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК вводят субъекту в дозе от примерно 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг.

Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК вводят субъекту подкожно.

Согласно одному варианту реализации способы согласно настоящему изобретению включают дополнительное определение уровня ANGPTL3 в образце(ах) от субъекта.

Согласно одному варианту реализации уровень ANGPTL3 в образце(ах) от субъекта представляет собой уровень белка ANGPTL3 в образце(ах) крови или сыворотки крови.

Согласно определенным вариантам реализации способы согласно настоящему изобретению дополнительно включают введение субъекту дополнительного терапевтического агента.

Согласно настоящему изобретению также предложены наборы, содержащие любую из дцРНК согласно настоящему изобретению или любую из фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению и необязательно инструкции по применению. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен набор для выполнения способа ингибирования экспрессии гена ANGPTL3 в клетке путем приведения клетки в контакт с двухцепочечным агентом РНКи (РНК-интерференции) согласно настоящему изобретению в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии ANGPTL3 в клетке. Набор содержит агент РНКи и инструкции по применению и необязательно средства для введения агента РНКи субъекту.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи представляет собой его фармацевтически приемлемую соль. «Фармацевтически приемлемые соли» каждого из агентов РНКи в настоящем документе включают, но не ограничиваются перечисленными, натриевую соль, кальциевую соль, литиевую соль, калиевую соль, аммониевую соль, магниевую соль, их смеси. Специалист в данной области техники поймет, что агент РНКи, если он предложен в виде поликатионной соли, имеет одну катионную группу на свободную кислотную группу необязательно модифицированного фосфодиэфирного остова и/или любые другие кислотные модификации (например, 5'-концевые фосфонатные группы). Например, олигонуклеотид из «n» нуклеотидов в длину содержит n-1 необязательно модифицированных фосфодиэфиров так, что олигонуклеотид из 21 нуклеотида в длину может быть предложен в виде соли, содержащей до 20 катионов (например, 20 катионов натрия). Аналогичным образом, агенты РНКи, имеющие смысловую цепь из 21 нуклеотида в длину и антисмысловую цепь из 23 нуклеотидов в длину, могут быть предложены в виде соли, содержащей до 42 катионов (например, 42 катиона натрия). В предыдущем примере, в котором агент РНКи также включает 5'-концевой фосфат или 5'-концевую винилфосфонатную группу, агент РНКи может быть предложен в виде соли, содержащей до 44 катионов (например, 44 катиона натрия).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигуры 1А и 1В представляют собой графики, показывающие уровни белка ANGPTL3 человека в образцах сыворотки крови мышей (n=3 на группу), которым подкожно вводили однократную дозу 3 мг/кг указанных дуплексов дцРНК. Образцы сыворотки крови собирали на день 7 или день 14 после введения дозы. Уровни белка ANGPTL3 человека определяли с помощью ИФА. **Фигура 1А** показывает групповые средние значения со стандартным отклонением. **Фигура 1В** показывает отдельные точки со стандартным отклонением.

Фигура 2 представляет собой график, показывающий уровни мРНК ANGPTL3 человека у мышей (n=3 на группу), которым подкожно вводили однократную дозу указанных дуплексов дцРНК, на день 14 после введения дозы. Уровни мРНК ANGPTL3

человека показаны относительно контрольных уровней, детектированных при обработке ФСБ.

Фигура 3 представляет собой график, показывающий уровень белка ANGPTL3 в сыворотках крови яванских макаков ($n=3$ на группу), которым подкожно вводили однократную дозу 3 мг/кг или дозу 10 мг/кг AD-1331212, AD-1331213 или AD-1479372. Уровни ANGPTL3 показаны как процентное изменение по сравнению с Днем 0 (день введения дозы).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему изобретению предложены композиции иРНК, с помощью которых осуществляют опосредуемое РНК-индуцированным комплексом сайленсинга (RISC) расщепление транскриптов РНК гена ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3). Ген может находиться внутри клетки, например, клетки в организме субъекта, такого как человек. Применение указанных иРНК обеспечивает нацеленную деградацию мРНК соответствующего гена (ANGPTL3) у млекопитающих.

иРНК согласно настоящему изобретению сконструированы для нацеливания на ген ангиопоэтин-подобного белка 3 человека (ANGPTL3), включая части гена, которые являются консервативными в ортологах ANGPTL3 других видов млекопитающих. Не ограничиваясь теорией, полагают, что комбинация или подкомбинация указанных выше свойств и конкретных целевых сайтов или конкретные модификации в указанных иРНК обеспечивают иРНК согласно настоящему изобретению улучшенную эффективность, стабильность, активность, долговечность и безопасность.

Соответственно, согласно настоящему изобретению предложены способы лечения и предотвращения нарушения, ассоциированного с ангиопоэтин-подобным 3 (ANGPTL3), например, нарушения метаболизма липидов, такого как гиперлипидемия или гипертриглицеридемия, с применением композиций иРНК, с помощью которых осуществляют опосредуемое РНК-индуцированным комплексом сайленсинга (RISC) расщепление транскриптов РНК гена ANGPTL3.

иРНК согласно настоящему изобретению включают цепь РНК (антисмысловую цепь), имеющую область, длина которой составляет до примерно 30 нуклеотидов или меньше, например, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида в длину, причем указанная область по существу комплементарна по меньшей мере части транскрипта мРНК гена ANGPTL3.

Согласно определенным вариантам реализации длина одной или обеих цепей двухцепочечных агентов РНКи согласно настоящему изобретению составляет до 66 нуклеотидов, например, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 нуклеотида в длину с областью из по меньшей мере 19 последовательных нуклеотидов, которая по существу комплементарна по меньшей мере части транскрипта мРНК гена ANGPTL3. Согласно некоторым вариантам реализации такие агенты иРНК, имеющие антисмысловые цепи большей длины, могут включать, например, вторую цепь РНК (смысловую цепь) из 20-60

нуклеотидов в длину, причем указанная смысловая и антисмысловая цепи образуют дуплекс из 18-30 последовательных нуклеотидов.

Применение иРНК согласно настоящему изобретению обеспечивает нацеленную деградацию мРНК соответствующего гена (гена ANGPTL3) у млекопитающих. С помощью анализов *in vitro* авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что иРНК, нацеленные на ген ANGPTL3, могут эффективно опосредовать РНКи, что приводит к значительному ингибированию экспрессии гена ANGPTL3. Таким образом, способы и композиции, включающие указанные иРНК, можно применять для лечения субъекта, имеющего ANGPTL3-ассоциированное нарушение, например, нарушение метаболизма липидов, такое как гиперлипидемия или гипертриглицеридемия.

Соответственно, согласно настоящему изобретению предложены способы и виды комбинированной терапии для лечения субъекта, который имеет нарушение, при котором может быть получена польза от ингибирования или снижения экспрессии гена ANGPTL3, например, заболевание, ассоциированное с ангиопоэтин-подобным 3 (ANGPTL3), такое как нарушение метаболизма липидов, например, гиперлипидемия или гипертриглицеридемия, с применением композиций иРНК, с помощью которых осуществляют опосредуемое РНК-индуцированным комплексом сайленсинга (RISC) расщепление транскриптов РНК гена ANGPTL3.

Согласно настоящему изобретению также предложены способы предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть получена польза от ингибирования или снижения экспрессии гена ANGPTL3, например, нарушение метаболизма липидов, такое как гиперлипидемия или гипертриглицеридемия.

В следующем подробном описании раскрыты способы получения и применения композиций, содержащих иРНК, для ингибирования экспрессии гена ANGPTL3, а также композиции, варианты применения и способы лечения субъектов, которые могут получить пользу в результате ингибирования и/или снижения экспрессии гена ANGPTL3, например, субъектов, которые подвержены развитию или у которых диагностировано ANGPTL3-ассоциированное нарушение.

I. Определения

Чтобы облегчить понимание настоящего изобретения, сначала приведены определения некоторых терминов. Кроме того, следует отметить, что при указании значения или диапазона значений параметра, предполагается, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к указанным значениям, также являются частью настоящего изобретения.

Неопределенные артикли (соотв., «а» и «an» в исходном тексте на английском языке) используются в настоящем документе для обозначения одного или более чем одного (т.е. по меньшей мере одного) грамматического объекта артикля. В качестве примера, «элемент» означает один элемент или более одного элемента, например, множество элементов.

Термин «включая» используется в настоящем документе для обозначения выражения «включая без ограничения» и используется взаимозаменяемо с ним.

Термин «или» используется в настоящем документе для обозначения термина «и/или» и используется взаимозаменяемо с ним, если контекст явно не указывает на иное. Например, «смысловая цепь или антисмысловая цепь» понимается как «смысловая цепь или антисмысловая цепь или смысловая цепь и антисмысловая цепь».

Термин «примерно» используется в настоящем документе для обозначения нахождения в пределах типичных диапазонов допусков в данной области техники. Например, «примерно» можно понимать как примерно 2 стандартных отклонения от среднего значения. Согласно определенным вариантам реализации «примерно» означает $\pm 10\%$. Согласно определенным вариантам реализации «примерно» означает $\pm 5\%$. Если «примерно» предшествует ряду чисел или диапазону, следует понимать, что «примерно» может модифицировать каждое из чисел в ряду или диапазоне.

Под термином «по меньшей мере», «не менее чем» или «или более» перед числом или рядом чисел понимается включение числа, смежного с термином «по меньшей мере», и всех последующих чисел или целых чисел, которые могут быть логически включены, как ясно из контекста. Например, число нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты должно быть целым числом. Например, «по меньшей мере 19 нуклеотидов 21-нуклеотидной молекулы нуклеиновой кислоты» означает, что 19, 20 или 21 нуклеотид имеет указанное свойство. Если «по меньшей мере» предшествует ряду чисел или диапазону, следует понимать, что «по меньшей мере» может модифицировать каждое из чисел в ряду или диапазоне.

В настоящем документе «не более чем» или «или менее» понимается как значение, относящееся к выражению и логическим более низким значениям или целым числам, как логически следует из контекста, до нуля. Например, дуплекс с липким концом из «не более чем 2 нуклеотидов» имеет липкий конец из 2, 1 или 0 нуклеотидов. Если «не более чем» предшествует ряду чисел или диапазону, следует понимать, что «не более чем» может модифицировать каждое из чисел в ряду или диапазоне. В настоящем документе диапазоны включают как верхний, так и нижний предел.

В настоящем документе способы детектирования могут включать определение того, что количество присутствующего аналита находится ниже уровня детектирования способа.

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

В случае противоречия между последовательностью и ее указанным сайтом на транскрипте или другой последовательности нуклеотидная последовательность, приведенная в описании, имеет приоритет.

В настоящем документе «ангиопоэтин-подобный 3», используемый взаимозаменяемо с термином «ANGPTL3», относится к хорошо известному гену, который кодирует представителя семейства секретируемых белков, участвующих в ангиогенезе. Кодированный белок, который экспрессируется преимущественно в печени, дополнительно процессируется в N-концевую суперспиральную доменосодержащую цепь и C-концевую

фибриногеновую цепь. N-концевая цепь важна для метаболизма липидов, в то время как C-концевая цепь может быть вовлечена в ангиогенез. Мутации в этом гене вызывают семейную гипобеталиппротеинемию типа 2.

Последовательность транскрипта мРНК ANGPTL3 человека можно найти, например, под номером доступа GenBank GI: 452408443 (NM_014495.3; SEQ ID NO:1; обратнoкомплементарная последовательность, SEQ ID NO: 2) или номером доступа GenBank GI: 41327750 (NM_014495.2; SEQ ID NO: 3; обратнoкомплементарная последовательность, SEQ ID NO: 4). Последовательность мРНК ANGPTL3 мыши можно найти, например, под номером доступа GenBank GI: 142388354 (NM_013913.3; SEQ ID NO:5; обратнoкомплементарная последовательность, SEQ ID NO: 6). Последовательность мРНК ANGPTL3 крысы можно найти, например, под номером доступа GenBank GI: 68163568 (NM_001025065.1; SEQ ID NO:7; обратнoкомплементарная последовательность, SEQ ID NO: 8). Последовательность мРНК ANGPTL3 *Macaca fascicularis* можно найти, например, под номером доступа в GenBank GI: 982227663 (XM_005543185.2; SEQ ID NO: 9; обратнoкомплементарная последовательность, SEQ ID NO: 10). Последовательность мРНК ANGPTL3 *Macaca mulatta* можно найти, например, под номером доступа в GenBank GI: 297278846 (XM_001086114.2; SEQ ID NO: 11; обратнoкомплементарная последовательность, SEQ ID NO: 12).

Дополнительные примеры последовательностей мРНК ANGPTL3 легко доступны через общедоступные базы данных, например, GenBank, UniProt, OMIM и веб-сайт проекта генома макака.

Дополнительную информацию о ANGPTL3 можно найти, например, по адресу www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=ANGPTL3.

Полное содержание каждого из вышеуказанных номеров доступа в GenBank и номеров базы данных генов включено в настоящий документ посредством ссылки на дату подачи данной заявки.

Термин ANGPTL3 в контексте настоящего документа также относится к вариациям гена ANGPTL3, включая варианты, представленные в базе данных SNP. Были идентифицированы многочисленные вариации последовательности в гене ANGPTL3, и их можно найти, например, в NCBI dbSNP и UniProt (см., например, www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=ANGPTL3, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки на дату подачи настоящей заявки). Неограничивающие примеры SNP в гене ANGPTL3 можно найти в базе данных SNP NCBI под регистрационными номерами rs193064039; rs192778191; rs192764027; rs192528948; rs191931953; rs191293319; rs191171206; rs191145608; rs191086880; rs191012841; или rs190255403.

В настоящем документе «целевая последовательность» относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной во время транскрипции гена ANGPTL3, включая мРНК, которая представляет собой продукт процессинга РНК первичного транскрипционного продукта. Согласно одному варианту

реализации целевая часть последовательности будет по меньшей мере достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для иРНК-направленного расщепления в этой части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной во время транскрипции гена ANGPTL3, или вблизи нее.

Целевая последовательность может иметь примерно 19-36 нуклеотидов в длину, например, примерно 19-30 нуклеотидов в длину. Например, целевая последовательность может иметь примерно 19-30 нуклеотидов, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида в длину. Согласно определенным вариантам реализации целевая последовательность представляет собой 19-23 нуклеотида в длину, необязательно 21-23 нуклеотида в длину. Диапазоны и длины, которые являются промежуточными для указанных выше диапазонов и длин, также предусмотрены как часть настоящего изобретения.

В настоящем документе термин «цепь, содержащая последовательность» относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которая описана последовательностью, описанной с применением стандартной номенклатуры нуклеотидов.

Каждый из «G», «C», «A», «T» и «U» обычно обозначает нуклеотид, который содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил в качестве основания, соответственно. Однако будет понятно, что термин «рибонуклеотид» или «нуклеотид» также может относиться к модифицированному нуклеотиду, как более подробно описано ниже, или суррогатному заменяющему фрагменту (см., например, Таблицу 1). Специалисту в данной области техники будет хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть заменены другими фрагментами без существенного изменения свойств спаривания оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такой заменяющий фрагмент. Например, без ограничения, нуклеотид, содержащий инозин в качестве его основания, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть заменены в нуклеотидных последовательностях дцРНК, охарактеризованных в настоящем изобретении, нуклеотидом, содержащим, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любом месте олигонуклеотида могут быть заменены гуанином и урацилом, соответственно, с образованием неоднозначной пары оснований G-U с целевой мРНК. Последовательности, содержащие такие заменяющие фрагменты, подходят для композиций и способов, охарактеризованных в настоящем изобретении.

Термины «иРНК», «агент РНКи», «иРНК-агент», «агент РНК-интерференции», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к агенту, который содержит РНК, в соответствии с определением этого термина в настоящем документе, и который опосредует нацеленное расщепление транскрипта РНК посредством пути РНК-индуцированного комплекса сайленсинга (RISC). иРНК направляет специфичную в отношении последовательности деградацию мРНК посредством процесса, известного как

РНК-интерференция (РНКи). иРНК модулирует, например, ингибирует экспрессию гена *ANGPTL3* в клетке, например, в клетке в организме субъекта, такого как субъект-млекопитающее.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению включает одноцепочечную РНК, которая взаимодействует с последовательностью целевой РНК, например, последовательностью целевой мРНК *ANGPTL3*, для направления расщепления целевой РНК. Не ограничиваясь теорией, полагают, что длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, расщепляется эндонуклеазой типа III, известной как Dicer, на киРНК (Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, подобный рибонуклеазе-III фермент, процессирует дцРНК на короткие интерферирующие РНК из 19-23 пар оснований с характерными 3'-липкими концами из двух оснований (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). Затем киРНК встраиваются в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или более геликаз разматывают дуплекс киРНК, что позволяет комплементарной антисмысловой цепи направлять распознавание мишени (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). После связывания с подходящей целевой мРНК одна или более эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень, чтобы индуцировать сайленсинг (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188). Таким образом, согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к одноцепочечной РНК (киРНК), образованной в клетке, которая способствует образованию RISC-комплекса для осуществления сайленсинга целевого гена, т. е. гена *ANGPTL3*. Соответственно, термин «киРНК» также используется в настоящем документе для обозначения иРНК, как описано выше.

Согласно определенным вариантам реализации агент РНКи может представлять собой одноцепочечную киРНК (оцРНКи), которую вводят в клетку или организм для ингибирования целевой мРНК. Одноцепочечные агенты РНКи связываются с эндонуклеазой RISC, Argonaute 2, которая затем расщепляет целевую мРНК. Одноцепочечные киРНК обычно представляют собой 15-30 нуклеотидов и являются химически модифицированными. Дизайн и тестирование одноцепочечных киРНК описаны в патенте США № 8101348 и в Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Любая из антисмысловых нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе, может применяться в качестве одноцепочечной киРНК, описанной в настоящем документе, или как химически модифицированная с помощью способов, описанных в Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894.

Согласно определенным вариантам реализации «иРНК» для применения в композициях, вариантах применения и способах согласно настоящему изобретению представляет собой двухцепочечную РНК и в настоящем документе называется «агентом на основе двухцепочечной РНК», «двухцепочечной молекулой РНК (дцРНК)», «агентом на основе дцРНК» или «дцРНК». Термин «дцРНК» относится к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющему дуплексную структуру, содержащую две

антипараллельные и по существу комплементарные цепи нуклеиновой кислоты, называемые «смысловой» и «антисмысловой» ориентациями по отношению к целевой РНК, т. е. гену ANGPTL3. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения двухцепочечная РНК (дцРНК) запускает деградацию целевой РНК, например, мРНК, посредством посттранскрипционного механизма сайленсинга генов, называемого в настоящем документе РНК-интерференцией или РНКи.

В целом, большинство нуклеотидов каждой цепи молекулы дцРНК представляют собой рибонуклеотиды, но, как подробно описано в настоящем документе, каждая или обе цепи также могут включать один или более нерибонуклеотидов, например, дезоксирибонуклеотид или модифицированный нуклеотид. Кроме того, в данном описании «иРНК» может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; иРНК может включать значительные модификации в нескольких нуклеотидах. В настоящем документе термин «модифицированный нуклеотид» относится к нуклеотиду, имеющему независимо модифицированный сахарный фрагмент, модифицированную межнуклеотидную связь или модифицированное нуклеиновое основание или любую их комбинацию. Таким образом, термин модифицированный нуклеотид охватывает замены, добавления или удаление, например, функциональной группы или атома, в межнуклеозидных связях, сахарных фрагментах или нуклеиновых основаниях. Модификации, подходящие для применения в агентах согласно настоящему изобретению, включают все типы модификаций, раскрытых в настоящем документе или известных из уровня техники. Любые такие модификации, используемые в молекуле типа киРНК, включены в термин «иРНК» или «агент РНКи» для целей настоящего описания и формулы изобретения.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения включение дезоксинуклеотида, если он присутствует в агенте РНКи, можно считать представляющим собой модифицированный нуклеотид.

Дуплексная область может иметь любую длину, которая обеспечивает специфичную деградацию желаемой целевой РНК посредством пути RISC, и может находиться в диапазоне примерно 19-36 пар оснований в длину, например, примерно 19-30 пар оснований в длину, например, примерно 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 пар оснований в длину, например, примерно 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований в длину. Согласно определенным вариантам реализации дуплексная область представляет собой 19-21 пару оснований в длину, например, 21 пару оснований в длину. Диапазоны и длины, которые являются промежуточными для указанных выше диапазонов и длин, также предусмотрены как часть настоящего изобретения.

Две цепи, образующие дуплексную структуру, могут представлять собой различные части одной более крупной молекулы РНК, или они могут представлять собой отдельные молекулы РНК. Если две цепи являются частью одной более крупной молекулы и,

следовательно, соединены непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующих дуплексную структуру, то соединяющая цепь РНК называется «петлей шпильки». Петля шпильки может содержать по меньшей мере один неспаренный нуклеотид. Согласно некоторым вариантам реализации петля шпильки может содержать по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 23 или более неспаренных нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации петля шпильки может представлять собой 10 или менее нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации петля шпильки может представлять собой 8 или менее неспаренных нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации петля шпильки может представлять собой 4-10 неспаренных нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации петля шпильки может представлять собой 4-8 нуклеотидов.

Если две по существу комплементарные цепи дцРНК состоят из отдельных молекул РНК, эти молекулы не обязательно должны быть соединены, но могут быть ковалентно соединены. Если две цепи ковалентно соединены путем, отличным от непрерывной цепи нуклеотидов, между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующих дуплексную структуру, соединяющую структуру называют «линкером». Цепи РНК могут иметь одинаковое или различное число нуклеотидов. Максимальное число пар оснований представляет собой число нуклеотидов в самой короткой цепи дцРНК за вычетом любых липких концов, которые присутствуют в дуплексе. В дополнение к дуплексной структуре РНКи может содержать один или более нуклеотидных липких концов. Согласно одному варианту реализации агента РНКи по меньшей мере одна цепь содержит 3'-липкий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. Согласно другому варианту реализации по меньшей мере одна цепь содержит 3'-липкий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. Согласно другим вариантам реализации по меньшей мере одна цепь агента РНКи содержит 5'-липкий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. Согласно определенным вариантам реализации по меньшей мере одна цепь содержит 5'-липкий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. Согласно другим вариантам реализации как 3'-конец, так и 5'-конец одной цепи агента РНКи содержат липкий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида.

Согласно определенным вариантам реализации агент иРНК согласно настоящему изобретению представляет собой дцРНК, каждая цепь которой содержит 19-23 нуклеотида, которые взаимодействуют с последовательностью целевой РНК, например, геном ANGPTL3, для направления расщепления целевой РНК.

Согласно некоторым вариантам реализации иРНК согласно настоящему изобретению представляет собой дцРНК из 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, последовательностью целевой мРНК ANGPTL3, для направления расщепления целевой РНК.

В настоящем документе термин «нуклеотидный липкий конец» относится по меньшей мере к одному неспаренному нуклеотиду, который выступает из дуплексной

структуры двухцепочечной иРНК. Например, если 3'-конец одной цепи дцРНК выходит за пределы 5'-конца другой цепи, или наоборот, существует нуклеотидный липкий конец. дцРНК может содержать липкий конец по меньшей мере из одного нуклеотида; в качестве альтернативы, липкий конец может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или более. Нуклеотидный липкий конец может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Липкий(ие) конец(концы) может(могут) находиться на смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) липкого конца может(могут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах антисмысловой или смысловой цепи дцРНК.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь дцРНК имеет 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, которые являются липкими на 3'-конце или 5'-конце. Согласно одному варианту реализации смысловая цепь дцРНК имеет 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, которые являются липкими на 3'-конце или 5'-конце. Согласно другому варианту реализации один или более нуклеотидов в липком конце заменены нуклеозидтиофосфатом.

Согласно определенным вариантам реализации антисмысловая цепь дцРНК содержит 1-10 нуклеотидов, например, 0-3, 1-3, 2-4, 2-5, 4-10, 5-10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, которые являются липкими на 3'-конце или 5'-конце. Согласно одному варианту реализации смысловая цепь дцРНК имеет 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, которые являются липкими на 3'-конце или 5'-конце. Согласно другому варианту реализации один или более нуклеотидов в липком конце заменены нуклеозидтиофосфатом.

Согласно определенным вариантам реализации антисмысловая цепь дцРНК имеет 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, которые являются липкими на 3'-конце или 5'-конце. Согласно определенным вариантам реализации липкий конец на смысловой цепи или антисмысловой цепи, или на обеих цепях, может иметь большую длину, превышающую 10 нуклеотидов, например, 1-30 нуклеотидов, 2-30 нуклеотидов, 10-30 нуклеотидов, 10-25 нуклеотидов, 10-20 нуклеотидов или 10-15 нуклеотидов в длину. Согласно определенным вариантам реализации удлиненный липкий конец находится на смысловой цепи дуплекса. Согласно определенным вариантам реализации удлиненный липкий конец присутствует на 3'-конце смысловой цепи дуплекса. Согласно определенным вариантам реализации удлиненный липкий конец присутствует на 5'-конце смысловой цепи дуплекса. Согласно определенным вариантам реализации удлиненный липкий конец находится на антисмысловой цепи дуплекса. Согласно определенным вариантам реализации удлиненный липкий конец присутствует на 3'-конце антисмысловой цепи дуплекса. Согласно определенным вариантам реализации удлиненный липкий конец присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи дуплекса. Согласно определенным вариантам реализации один или более нуклеотидов в удлиненном

липком конце заменены нуклеозидтиофосфатом. Согласно определенным вариантам реализации липкий конец включает самокомплементарную часть таким образом, что липкий конец способен образовывать шпильчатую структуру, которая является стабильной в физиологических условиях.

«Тупой» или «тупой конец» означает, что на этом конце агента на основе двухцепочечной РНК отсутствуют неспаренные нуклеотиды, т. е. отсутствует нуклеотидный липкий конец. Агент на основе двухцепочечной РНК с «тупыми концами» является двухцепочечным по всей длине, т. е. не имеет нуклеотидного липкого конца ни на одном конце молекулы. Агенты РНКи согласно настоящему изобретению включают агенты РНКи без нуклеотидного липкого конца на одном конце (т.е. агенты с одним липким концом и одним тупым концом) или без нуклеотидных липких концов на любом конце. Чаще всего такая молекула будет иметь двухцепочечную структуру по всей своей длине.

Термин «антисмысловая цепь» или «направляющая цепь» относится к цепи иРНК, например, дцРНК, которая включает область, которая по существу комплементарна целевой последовательности, например, мРНК ANGPTL3.

В настоящем документе термин «область комплементарности» относится к области на антисмысловой цепи, которая по существу комплементарна последовательности, например, целевой последовательности, например, нуклеотидной последовательности ANGPTL3, определенной в настоящем документе. Если область комплементарности не полностью комплементарна целевой последовательности, несовпадения могут находиться во внутренних или концевых областях молекулы. Обычно наиболее переносимые несоответствия находятся в концевых областях, например, в пределах 5, 4 или 3 нуклеотидов 5'-или 3'-конца иРНК. Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе двухцепочечной РНК согласно настоящему изобретению включает несовпадение нуклеотидов в антисмысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь агента на основе двухцепочечной РНК согласно настоящему изобретению включает не более 4 несовпадений с целевой мРНК, например, антисмысловая цепь включает 4, 3, 2, 1 или 0 несовпадений с целевой мРНК. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь агента на основе двухцепочечной РНК согласно настоящему изобретению включает не более 4 несовпадений со смысловой цепью, например, антисмысловая цепь включает 4, 3, 2, 1 или 0 несовпадений со смысловой цепью. Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе двухцепочечной РНК согласно настоящему изобретению включает несовпадение нуклеотидов в смысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь агента на основе двухцепочечной РНК согласно настоящему изобретению включает не более 4 несовпадений с антисмысловой цепью, например, смысловая цепь включает 4, 3, 2, 1 или 0 несовпадений с антисмысловой цепью. Согласно некоторым вариантам реализации несовпадение нуклеотидов находится, например, в пределах 5, 4, 3 нуклеотидов от 3'-конца иРНК. Согласно другому варианту реализации несовпадение нуклеотидов находится,

например, в 3'-концевом нуклеотиде агента иРНК. Согласно некоторым вариантам реализации несовпадение(я) не присутствует(ют) в затравочной области.

Таким образом, агент РНКи, описанный в настоящем документе, может содержать одно или более несовпадений с целевой последовательностью. Согласно одному варианту реализации агент РНКи, описанный в настоящем документе, содержит не более 3 несовпадений (т. е. 3, 2, 1 или 0 несовпадений). Согласно одному варианту реализации агент РНКи, описанный в настоящем документе, содержит не более 2 несовпадений. Согласно одному варианту реализации агент РНКи, описанный в настоящем документе, содержит не более 1 несовпадения. Согласно одному варианту реализации агент РНКи, описанный в настоящем документе, содержит 0 несовпадений. Согласно определенным вариантам реализации, если антисмысловая цепь агента РНКи содержит несовпадения с целевой последовательностью, несовпадение необязательно может быть ограничено нахождением в пределах последних 5 нуклеотидов либо 5'-конца, либо 3'-конца области комплементарности. Например, в таких вариантах реализации для 23-нуклеотидного агента РНКи цепь, которая комплементарна области гена ANGPTL3, обычно не содержит какого-либо несовпадения в пределах 13 центральных нуклеотидов. Способы, описанные в настоящем документе, или способы, известные в данной области техники, можно применять для определения того, является ли агент РНКи, содержащий несовпадение с целевой последовательностью, эффективным в ингибировании экспрессии гена ANGPTL3. Рассмотрение эффективности агентов РНКи с несовпадениями в ингибировании экспрессии гена ANGPTL3 является важным, в частности, если известно, что конкретная область комплементарности в гене ANGPTL3 имеет полиморфную вариацию последовательности в популяции.

Термин «смысловая цепь» или «пассажирская цепь» в контексте настоящего документа относится к цепи иРНК, которая включает область, которая по существу комплементарна области антисмысловой цепи, в соответствии с определением этого термина в настоящем документе.

В настоящем документе термин «по существу все нуклеотиды модифицированы» означает в значительной степени, но не полностью, модифицированы и могут включать не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида.

В настоящем документе термин «область расщепления» относится к области, которая расположена непосредственно рядом с сайтом расщепления. Сайт расщепления представляет собой сайт на мишени, в котором происходит расщепление. Согласно некоторым вариантам реализации область расщепления содержит три основания на любом конце сайта расщепления и непосредственно рядом с ним. Согласно некоторым вариантам реализации область расщепления содержит два основания на любом конце сайта расщепления и непосредственно рядом с ним. Согласно некоторым вариантам реализации сайт расщепления конкретно находится в сайте, связываемом нуклеотидами 10 и 11 антисмысловой цепи, и область расщепления содержит нуклеотиды 11, 12 и 13.

В настоящем документе, и если не указано иное, термин «комплементарный» при использовании для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, гибридизироваться и образовывать дуплексную структуру при определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, как будет понятно специалисту в данной области техники. Такие условия могут представлять собой, например, строгие условия, причем указанные строгие условия могут включать: 400 мМ NaCl, 40 мМ PIPES, pH 6,4, 1 мМ ЭДТА, 50°C или 70°C в течение 12-16 часов с последующим промыванием (см., например, «Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, *et al.* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Могут применяться другие условия, такие как физиологически уместные условия, которые могут встречаться внутри организма. Специалист в данной области техники сможет определить набор условий, наиболее подходящих для тестирования комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизованных нуклеотидов.

Комплементарные последовательности в пределах иРНК, например, в пределах дцРНК, описанной в настоящем документе, включают спаривание оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. В настоящем документе такие последовательности могут называться «полностью комплементарными» по отношению друг к другу. Однако, если в настоящем документе первая последовательность называется «по существу комплементарной» по отношению ко второй последовательности, две последовательности могут быть полностью комплементарными или они могут образовывать одну или более, но обычно не более 5, 4, 3 или 2 несовпадающих пар оснований после гибридизации для дуплекса до 30 пар оснований, сохраняя при этом способность к гибридизации в условиях, наиболее соответствующих их конечному применению, например, ингибированию экспрессии гена *in vitro* или *in vivo*. Однако если два олигонуклеотида сконструированы, чтобы образовывать при гибридизации один или более одноцепочечных липких концов, такие липкие концы не должны рассматриваться как несовпадения в отношении определения комплементарности. Например, дцРНК, содержащая один олигонуклеотид из 21 нуклеотида в длину и другой олигонуклеотид из 23 нуклеотидов в длину, в которой более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, все еще может называться «полностью комплементарной» для целей, описанных в настоящем документе.

«Комплементарные» последовательности в контексте настоящего документа также могут включать или могут быть полностью образованы из пар оснований, отличных от пар по Уотсону-Крику, или пар оснований, образованных из неприродных и

модифицированных нуклеотидов, в той степени, в которой выполняются вышеуказанные требования в отношении их способности к гибридизации. Такие пары оснований, отличные от пар по Уотсону-Крику, включают, но не ограничиваются этим, неоднозначное спаривание оснований G:U или спаривание по Хугстину.

Термины «комплементарный», «полностью комплементарный» и «по существу комплементарный» в настоящем документе можно применять в отношении совпадения оснований между смысловой цепью и антисмысловой цепью дцРНК или между двумя олигонуклеотидами или полинуклеотидами, например, антисмысловой цепью агента на основе двухцепочечной РНК и целевой последовательностью, как будет понятно из контекста их применения.

В настоящем документе полинуклеотид, который «по существу комплементарен по меньшей мере части» матричной РНК (мРНК), относится к полинуклеотиду, который по существу комплементарен непрерывной части представляющей интерес мРНК (например, мРНК, кодирующей ген ANGPTL3). Например, полинуклеотид является комплементарным по меньшей мере части мРНК ANGPTL3, если последовательность является по существу комплементарной непрерывной части мРНК, кодирующей ген ANGPTL3.

Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, являются полностью комплементарными целевой последовательности ANGPTL3. Согласно другим вариантам реализации антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, по существу комплементарны целевой последовательности ANGPTL3 и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентной области нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 или 11, или фрагменту любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 или 11, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99%.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, по существу комплементарны фрагменту целевой последовательности ANGPTL3 и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине фрагменту SEQ ID NO:1, выбранному из группы нуклеотидов 73-102, 73-124, 80-114, 291-320, 291-342, 307-336, 540-567, 540-589 и 545-577 SEQ ID NO: 1, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99%.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, по существу комплементарны фрагменту целевой последовательности ANGPTL3 и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине фрагменту SEQ ID NO:1, выбранному из группы нуклеотидов 80-102; 84-106; 87-109; 91-

113; 92-114; 186-208; 307-329; 308-330; 310-332; 314-336; 545-567; 551-573; 553-575; 554-576; 555-577; 1133-1155; или 1140-1162 SEQ ID NO: 1, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99%.

Согласно другим вариантам реализации антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, по существу комплементарны целевой последовательности ANGPTL3 и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на примерно 80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи в любой из Таблиц 2-3 и 7-8, или фрагменту любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи в любой из Таблиц 2-3 и 7-8, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или 100%.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению включает смысловую цепь, которая по существу комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, аналогичен целевой последовательности ANGPTL3, и причем указанный полинуклеотид смысловой цепи содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на примерно 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентной области нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 или 12, или фрагменту любой из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 или 12, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или 100%.

Согласно некоторым вариантам реализации иРНК согласно настоящему изобретению включает смысловую цепь, которая по существу комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, комплементарен целевой последовательности ANGPTL3, и причем указанный полинуклеотид смысловой цепи содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на примерно 80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи в любой из Таблиц 2-3 и 7-8 или фрагменту любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи в любой из Таблиц 2-3 и 7-8, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или 100%.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1331203.1; AD-1331206.1; AD-1331209.1; AD-1331212.1; AD-1331213.1; AD-1331329.1; AD-1331237.1; AD-

1331238.1; AD-1331240.1; AD-1331244.1; AD-1331256.1; AD-1331262.1; AD-1331264.1; AD-1331265.1; AD-1331266.1; AD-1331316.1; и AD-1331338.1.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1331203.1; AD-1331206.1; AD-1331209.1; AD-1331212.1; AD-1331213.1; AD-1331329.1; AD-1331240.1; AD-1331262.1; AD-1331264.1; AD-1331265.1 и AD-1331266.1. Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1331203.1; AD-1331206.1; AD-1331209.1; AD-1331212.1; и AD-1331213.1.

В целом, «иРНК» включает рибонуклеотиды с химическими модификациями. Такие модификации могут включать все типы модификаций, раскрытых в настоящем документе или известных из уровня техники. Любые такие модификации, используемые в молекуле дцРНК, включены в термин «иРНК» для целей настоящего описания и формулы изобретения.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения включение дезокси-нуклеотида, если он присутствует в агенте РНКи, можно считать представляющим собой модифицированный нуклеотид.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения агент для применения в способах и композициях согласно настоящему изобретению представляет собой молекулу одноцепочечного антисмыслового олигонуклеотида, которая ингибирует целевую мРНК посредством механизма антисмыслового ингибирования. Молекула одноцепочечного антисмыслового олигонуклеотида комплементарна последовательности в целевой мРНК. Одноцепочечные антисмысловые олигонуклеотиды могут ингибировать трансляцию стехиометрическим способом путем спаривания оснований с мРНК и физического затруднения трансляции, см. Dias, N. *et al.*, (2002) *Mol Cancer Ther* 1:347-355. Молекула одноцепочечного антисмыслового олигонуклеотида может представлять собой от примерно 14 до примерно 30 нуклеотидов в длину и может иметь последовательность, комплементарную целевой последовательности. Например, молекула одноцепочечного антисмыслового олигонуклеотида может содержать последовательность, которая представляет собой по меньшей мере примерно 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более непрерывных нуклеотидов из любой из антисмысловых последовательностей, описанных в настоящем документе.

Выражение «приведение клетки в контакт с иРНК», такой как дцРНК, в контексте настоящего документа включает приведение клетки в контакт с помощью любых возможных средств. Приведение клетки в контакт с иРНК включает приведение клетки в контакт *in vitro* с иРНК или приведение клетки в контакт *in vivo* с иРНК. Приведение в

контакт может быть выполнено непосредственно или опосредованно. Таким образом, например, иРНК может быть приведена в физический контакт с клеткой индивидуумом, выполняющим способ, или, в качестве альтернативы, иРНК можно поместить в ситуацию, которая позволит или вынудит ее впоследствии вступить в контакт с клеткой.

Контакт с клеткой *in vitro* можно осуществлять, например, путем инкубации клетки с иРНК. Контакт с клеткой *in vivo* можно осуществлять, например, путем инъекции иРНК в ткань или вблизи нее, где расположена клетка, или путем инъекции иРНК в другую область, например, в кровоток или подкожное пространство, таким образом, что агент впоследствии достигнет ткани, где находится клетка, подлежащая приведению в контакт. Например, иРНК может содержать или может быть связана с лигандом, например, GalNAc, который направляет иРНК в представляющий интерес сайт, например, в печень. Также возможны комбинации способов приведения в контакт *in vitro* и *in vivo*. Например, клетку также можно приводить в контакт *in vitro* с иРНК и впоследствии трансплантировать субъекту.

Согласно определенным вариантам реализации приведение клетки в контакт с иРНК включает «введение» или «доставку иРНК в клетку» путем облегчения или осуществления поглощения или всасывания в клетку. Всасывание или поглощение иРНК может происходить посредством пассивной диффузии или активных клеточных процессов или с помощью вспомогательных агентов или устройств. Введение иРНК в клетку можно осуществлять *in vitro* или *in vivo*. Например, для введения *in vivo* иРНК можно вводить путем инъекции в участок ткани или вводить системно. Введение *in vitro* в клетку включает способы, известные в данной области техники, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны в настоящем документе ниже или известны в данной области техники.

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

В настоящем документе «субъект» представляет собой животное, такое как млекопитающее, включая примата (такого как человек, отличный от человека примат, например, обезьяна и шимпанзе), отличное от примата животное (такое как корова, свинья, лошадь, коза, кролик, овца, хомяк, морская свинка, кошка, собака, крыса или мышь), или птица, которое экспрессирует целевой ген эндогенно или гетерологично. Согласно варианту реализации субъект представляет собой человека, такого как человек, которого лечат или оценивают на наличие заболевания или нарушения, при котором может быть получена польза от снижения экспрессии ANGPTL3; человека, подверженного риску развития заболевания или нарушения, при котором может быть получена польза от снижения экспрессии ANGPTL3; человека, имеющего заболевание или нарушение, при котором может быть получена польза от снижения экспрессии ANGPTL3; или человека, у

которого лечат заболевание или нарушение, при котором может быть получена польза от снижения экспрессии ANGPTL3, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации субъект представляет собой женщину. Согласно другим вариантам реализации субъект представляет собой мужчину. Согласно одному варианту реализации субъект представляет собой взрослого субъекта. Согласно другому варианту реализации субъект представляет собой педиатрического субъекта.

В настоящем документе термины «осуществлять лечение» или «лечение» относятся к благоприятному или желаемому результату, такому как уменьшение по меньшей мере одного признака или симптома ANGPTL3-ассоциированного нарушения у субъекта. Лечение также включает уменьшение одного или более признаков или симптомов, ассоциированных с нежелательной экспрессией ANGPTL3; уменьшение степени нежелательной активации или стабилизации ANGPTL3; уменьшение или облегчение нежелательной активации или стабилизации ANGPTL3. «Лечение» также может означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения. Термин «более низкий» в контексте уровня ANGPTL3 у субъекта или маркера заболевания или симптома относится к статистически достоверному уменьшению такого уровня. Уменьшение может представлять собой, например, по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, %, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более. Согласно определенным вариантам реализации уменьшение составляет по меньшей мере 20%. Согласно определенным вариантам реализации уменьшение представляет собой по меньшей мере 50% уменьшение маркера заболевания, например, уровня экспрессии белка или гена. «Более низкий» в контексте уровня ANGPTL3 у субъекта представляет собой уменьшение до уровня, который принят как находящийся в пределах нормального диапазона для индивидуума без такого нарушения. Согласно определенным вариантам реализации «более низкий» представляет собой уменьшение различия между уровнем маркера или симптома у субъекта, страдающего заболеванием, и уровнем, который принят как находящийся в пределах нормального диапазона для индивидуума, например, уровень уменьшения веса тела между индивидуумом с ожирением и индивидуумом, имеющим вес, принятый как находящийся в пределах нормального диапазона.

В настоящем документе «предотвращение» или «предотвращать» при использовании в отношении заболевания, нарушения или состояния, которое можно лечить или облегчать путем снижения экспрессии гена ANGPTL3, относится к снижению вероятности развития у субъекта симптома, связанного с таким заболеванием, нарушением или состоянием, например, симптома нежелательной или чрезмерной экспрессии ANGPTL3, такого как высокие уровни триглицеридов или эруптивная ксантома. Вероятность развития высоких уровней триглицеридов или эруптивной ксантомы снижается, например, когда у индивидуума, имеющего один или более факторов риска в отношении высоких уровней триглицеридов или эруптивной ксантомы, либо не развивается высокий уровень триглицеридов или эруптивная ксантома, либо развивается высокий уровень триглицеридов или эруптивная ксантома с меньшей степенью тяжести по

сравнению с популяцией, имеющей те же факторы риска и не получающей лечения, как описано в настоящем документе. Невозможность развития заболевания, нарушения или состояния или снижение вероятности развития симптома, связанного с таким заболеванием, нарушением или состоянием (например, по меньшей мере примерно на 10% по клинически приемлемой шкале для этого заболевания или нарушения), или появление отсроченных симптомов (например, на дни, недели, месяцы или годы) считается эффективным предотвращением.

В настоящем документе термин «липид сыворотки крови» относится к любому основному липиду, присутствующему в крови. Липиды сыворотки крови могут присутствовать в крови либо в свободной форме, либо в составе белкового комплекса, например, липопротеинового комплекса. Неограничивающие примеры липидов сыворотки крови могут включать триглицериды и холестерин, такой как общий холестерин (TG), холестерин липопротеинов низкой плотности (LDL-C), холестерин липопротеинов высокой плотности (HDL-C), холестерин липопротеинов очень низкой плотности (VLDL-C) и холестерин липопротеинов средней плотности (IDL-C).

В настоящем документе термин «ассоциированное с ангиопоэтин-подобным 3 заболевание» или «ANGPTL3-ассоциированное заболевание» представляет собой заболевание или нарушение, которое вызвано или ассоциировано с экспрессией гена ANGPTL3 или продукцией белка ANGPTL3. Термин «ANGPTL3-ассоциированное заболевание» включает заболевание, нарушение или состояние, при котором может быть получена польза от уменьшения экспрессии, репликации гена ANGPTL3 или активности белка ANGPTL3. Согласно некоторым вариантам реализации ANGPTL3-ассоциированное заболевание представляет собой нарушение метаболизма липидов.

В настоящем документе термин «нарушение метаболизма липидов» относится к любому нарушению, ассоциированному с нарушением метаболизма липидов или вызванному им. Например, этот термин включает любое нарушение, заболевание или состояние, которое может привести к гиперлипидемии, или состояние, характеризующееся патологическим повышением уровней любого или всех липидов и/или липопротеинов в крови. Этот термин относится к наследственному нарушению, такому как семейная гипертриглицеридемия, семейная парциальная липодистрофия типа 1 (FPLD1), или индуцированному или приобретенному нарушению, такому как нарушение, индуцированное или приобретенное в результате заболевания, нарушения или состояния (например, почечная недостаточность), рациона или приема определенных лекарственных средств (например, в результате высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ), применяемой для лечения, например, СПИДа или ВИЧ). Примеры нарушений метаболизма липидов включают, но не ограничиваются ими, атеросклероз, дислипидемию, гипертриглицеридемию (включая гипертриглицеридемию, индуцированную лекарственными средствами, гипертриглицеридемию, индуцированную диуретиками, гипертриглицеридемию, индуцированную алкоголем, гипертриглицеридемию, индуцированную β -адреноблокаторами, гипертриглицеридемию, индуцированную

эстрогенами, глюкокортикоид-индуцированную гипертриглицеридемию, ретиноид-индуцированную гипертриглицеридемию, циметидин-индуцированную гипертриглицеридемию и семейную гипертриглицеридемию), острый панкреатит, ассоциированный с гипертриглицеридемией, хиломикронный синдром, семейную хиломикронемию, дефицит или резистентность Apo-E, дефицит или гипоактивность LPL, гиперлипидемию (включая семейную комбинированную гиперлипидемию) гиперхолестеринемию, подагру, ассоциированную с гиперхолестеринемией, ксантоматоз (подкожные отложения холестерина), гиперлипидемию с гетерогенным дефицитом LPL и гиперлипидемию с высоким уровнем LDL и гетерогенным дефицитом LPL.

Сердечно-сосудистые заболевания, ассоциированные с нарушениями метаболизма липидов, также считаются «нарушениями метаболизма липидов», как определено в настоящем документе. Эти заболевания могут включать атеросклеротическую болезнь сердца (также называемую ишемической болезнью сердца), воспаление, ассоциированное с ишемической болезнью сердца, рестеноз, заболевания периферических сосудов и инсульт.

Нарушения, связанные с массой тела, также считаются «нарушениями метаболизма липидов», как определено в настоящем документе. Такие нарушения могут включать ожирение, метаболический синдром, включая независимые компоненты метаболического синдрома (например, центральное ожирение, FBG/предиабет/диабет, гиперхолестеринемию, гипертриглицеридемию и гипертензию), гипотиреоз, уремию и другие состояния, ассоциированные с набором массы тела (включая быстрое увеличение массы тела), потерю массы тела, поддержание потери массы тела или риск восстановления массы тела после потери массы тела.

Нарушения уровня сахара в крови также считаются «нарушениями метаболизма липидов», как определено в настоящем документе. Такие нарушения могут включать диабет, гипертонию и синдром поликистоза яичников, связанный с инсулинорезистентностью. Другие примерные нарушения метаболизма липидов также могут включать трансплантацию почки, нефротический синдром, синдром Кушинга, акромегалию, системную красную волчанку, дисглобулинемию, липодистрофию, гликогеноз I типа и болезнь Аддисона.

«Терапевтически эффективное количество» в контексте настоящего документа подразумевает включение количества агента РНКи, которое при введении субъекту, имеющему ANGPTL3-ассоциированное заболевание, является достаточным для осуществления лечения заболевания (например, путем ослабления, уменьшения или сохранения существующего заболевания или одного или более симптомов заболевания). «Терапевтически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от агента РНКи, способа введения агента, заболевания и его тяжести, а также анамнеза, возраста, массы тела, семейного анамнеза, генетического фона, типов предшествующих или сопутствующих видов лечения, если таковые имеются, и других индивидуальных характеристик субъекта, подлежащего лечению.

«Профилактически эффективное количество» в контексте настоящего документа подразумевает включение количества агента РНКи, которое при введении субъекту, имеющему ANGPTL3-ассоциированное нарушение, является достаточным для предотвращения или облегчения заболевания или одного или более симптомов заболевания. Облегчение заболевания включает замедление течения заболевания или снижение тяжести заболевания с более поздним началом. «Профилактически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от агента РНКи, способа введения агента, степени риска развития заболевания и анамнеза, возраста, массы тела, семейного анамнеза, генетического фона, типов предшествующих или сопутствующих видов лечения, если таковые имеются, и других индивидуальных характеристик пациента, подлежащего лечению.

«Терапевтически эффективное количество» или «профилактически эффективное количество» также включает количество агента РНКи, которое обеспечивает некоторый желаемый эффект при разумном соотношении польза/риск, применимом к любому лечению. иРНК, применяемую в способах согласно настоящему изобретению, можно вводить в достаточном количестве для получения разумного соотношения польза/риск, применимого к такому лечению.

Выражение «фармацевтически приемлемый» применяется в настоящем документе для обозначения тех соединений (включая соли), материалов, композиций или лекарственных форм, которые, в рамках обоснованного медицинского суждения, подходят для применения в контакте с тканями субъектов-людей и субъектов-животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерно разумному соотношению польза/риск.

Выражение «фармацевтически приемлемый носитель» в контексте настоящего документа означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, производственное вспомогательное вещество (например, смазывающее вещество, тальк, стеарат магния, кальция или цинка или стеариновую кислоту) или инкапсулирующий растворитель материал, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения из одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами состава и не должен быть вредным для субъекта, которого лечат. Такие носители известны из уровня техники. Фармацевтически приемлемые носители включают носители для введения путем инъекции.

Термин «образец» в контексте настоящего документа включает набор сходных жидкостей, клеток или тканей, выделенных у субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку крови и серозные жидкости, плазму, спинномозговую жидкость, глазные жидкости, лимфу, мочу, слюну и т. п. Образцы тканей могут включать образцы из тканей, органов или локализованных областей. Например, образцы могут быть

получены из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток в этих органах. Согласно определенным вариантам реализации образцы могут быть получены из печени (например, всей печени или определенных сегментов печени или определенных типов клеток в печени, таких как, например, гепатоциты). Согласно некоторым вариантам реализации «образец, полученный от субъекта» относится к моче, полученной от субъекта. «Образец, полученный от субъекта» может относиться к крови или полученной из крови сыворотке или плазме крови субъекта.

II. иРНК согласно настоящему изобретению

Согласно настоящему изобретению предложены иРНК, которые ингибируют экспрессию гена *ANGPTL3*. Согласно определенным вариантам реализации иРНК включает двухцепочечные молекулы рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии гена *ANGPTL3* в клетке, такой как клетка в организме субъекта, например, млекопитающего, такого как человек, подверженный развитию *ANGPTL3*-ассоциированного нарушения, например, нарушения метаболизма липидов, например, гиперлипидемии или гиперлипидемии. Агент дцРНК включает антисмысловую цепь, имеющую область комплементарности, которая комплементарна по меньшей мере части мРНК, образованной при экспрессии гена *ANGPTL3*. Область комплементарности составляет примерно 19-30 нуклеотидов в длину (например, примерно 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20 или 19 нуклеотидов в длину).

При контакте с клеткой, экспрессирующей ген *ANGPTL3*, иРНК ингибирует экспрессию гена *ANGPTL3* (например, гена *ANGPTL3* человека, примата, животного, отличного от примата, или крысы) по меньшей мере на примерно 50% по данным анализа с помощью, например, ПЦР или способа на основе разветвленной ДНК (bDNA) или способа на основе белка, например, иммунофлуоресцентного анализа с использованием, например, методик Вестерн-блоттинга или проточной цитометрии. Согласно определенным вариантам реализации ингибирование экспрессии определяют с помощью способа кПЦР, предусмотренного в примерах в настоящем документе, с киРНК в концентрации, например, 10 нМ, в линии клеток соответствующего организма, предложенной в настоящем документе. Согласно определенным вариантам реализации ингибирование экспрессии *in vivo* определяют путем нокдауна гена человека у грызуна, экспрессирующего ген человека, например, у мыши или мыши, инфицированной ААВ, экспрессирующей целевой ген человека, например, при введении в виде однократной дозы, например, при 3 мг/кг при наименьшей величине экспрессии РНК.

дцРНК включает две цепи РНК, которые комплементарны и гибридизуются с образованием дуплексной структуры в условиях, в которых будет применяться дцРНК. Одна цепь дцРНК (антисмысловая цепь) включает область комплементарности, которая по существу комплементарна и обычно полностью комплементарна целевой последовательности. Целевая последовательность может быть получена из последовательности мРНК, образованной во время экспрессии гена *ANGPTL3*. Другая цепь (смысловая цепь) включает область, которая комплементарна антисмысловой цепи так, что

две цепи гибридизуются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. Как описано в другом месте настоящего документа и как известно в данной области техники, комплементарные последовательности дцРНК также могут содержаться в качестве самокомплементарных областей одной молекулы нуклеиновой кислоты, в отличие от нахождения на отдельных олигонуклеотидах.

Обычно дуплексная структура представляет собой 15-30 пар оснований в длину, например, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований в длину. Согласно определенным вариантам реализации дуплексная структура представляет собой 18-25 пар оснований в длину, например, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-25, 21-24, 21-23, 21-22, 22-25, 22-24, 22-23, 23-25, 23-24 или 24-25 пар оснований в длину, например, 19-21 пару оснований в длину. Диапазоны и длины, которые являются промежуточными для указанных выше диапазонов и длин, также предусмотрены как часть настоящего изобретения.

Сходным образом, область комплементарности целевой последовательности представляет собой 15-30 нуклеотидов в длину, например, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида в длину, например, 19-23 нуклеотида в длину или 21-23 нуклеотида в длину. Диапазоны и длины, которые являются промежуточными для указанных выше диапазонов и длин, также предусмотрены как часть настоящего изобретения.

Согласно некоторым вариантам реализации дуплексная структура представляет собой от 19 до 30 пар оснований в длину. Сходным образом, область комплементарности целевой последовательности представляет собой от 19 до 30 нуклеотидов в длину.

Согласно некоторым вариантам реализации дцРНК представляет собой от примерно 19 до примерно 23 нуклеотидов в длину или от примерно 25 до примерно 30 нуклеотидов в длину. Обычно дцРНК является достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для фермента Dicer. Например, из уровня техники хорошо известно, что дцРНК длиннее примерно 21-23 нуклеотидов в длину могут служить в качестве субстратов Dicer. Обычный специалист в данной области техники также поймет, что область РНК, которая является мишенью для расщепления, чаще всего будет являться частью более крупной молекулы РНК, часто молекулы мРНК. В соответствующих случаях «часть» целевой мРНК представляет собой непрерывную последовательность целевой мРНК, имеющую достаточную длину, чтобы она могла быть субстратом для РНКи-направленного расщепления (т. е. расщепления посредством пути RISC).

Специалист в данной области техники также поймет, что дуплексная область представляет собой основную функциональную часть дцРНК, например, дуплексная область из примерно 19-30 пар оснований, например, примерно 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пар оснований. Таким образом, согласно одному варианту реализации, в той степени, в которой она(он) подвергается процессингу в функциональный дуплекс, например, из 15-30 пар оснований, который нацелен на желаемую РНК для расщепления, молекула РНК или комплекс молекул РНК, имеющих дуплексную область более 30 пар оснований, представляет собой дцРНК. Таким образом, обычный специалист в данной области техники поймет, что согласно одному варианту реализации миРНК представляет собой дцРНК. Согласно другому варианту реализации дцРНК не представляет собой встречающуюся в природе миРНК. Согласно другому варианту реализации агент иРНК, который можно применять для нацеливания на экспрессию ANGPTL3, не образуется в целевой клетке путем расщепления более крупной дцРНК.

ДцРНК, описанная в настоящем документе, может дополнительно включать один или более одноцепочечных нуклеотидных липких концов, например, 1-4, 2-4, 1-3, 2-3, 1, 2, 3 или 4 нуклеотида. дцРНК, имеющие по меньшей мере один нуклеотидный липкий конец, могут обладать превосходными ингибирующими свойствами по сравнению с их аналогами с тупыми концами. Нуклеотидный липкий конец может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Липкий(ие) конец(концы) может(могут) находиться на смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) липкого конца может(могут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах антисмысловой или смысловой цепи дцРНК.

ДцРНК может быть синтезирована с помощью стандартных способов, известных в данной области техники. Двухцепочечные соединения РНКи согласно настоящему изобретению можно получить с использованием двухэтапной процедуры. Сначала отдельные цепи двухцепочечной молекулы РНК получают по отдельности. Затем цепи-компоненты ренатурируют. Отдельные цепи соединения киРНК могут быть получены с использованием органического синтеза в жидкой фазе или в твердой фазе или и того, и другого. Преимуществом органического синтеза является легкое получение олигонуклеотидных цепей, содержащих неприродные или модифицированные нуклеотиды. Сходным образом, одноцепочечные олигонуклеотиды согласно настоящему изобретению могут быть получены с использованием органического синтеза в жидкой фазе или в твердой фазе или и того, и другого.

Согласно аспекту дцРНК согласно настоящему изобретению включает по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность. Смысловая цепь выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из Таблиц 2-3 и 7-8, и соответствующая антисмысловая цепь для смысловой цепи может быть выбрана из группы

последовательностей в любой из Таблиц 2-3 и 7-8. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, при этом одна из последовательностей по существу комплементарна последовательности мРНК, образованной при экспрессии гена ANGPTL3. Таким образом, в данном аспекте дцРНК будет включать два олигонуклеотида, причем один олигонуклеотид описан в качестве смысловой цепи в любой из Таблиц 2-3 и 7-8, и второй олигонуклеотид описан в качестве соответствующей антисмысловой цепи для смысловой цепи в любой из Таблиц 2-3 и 7-8.

Согласно определенным вариантам реализации по существу комплементарные последовательности дцРНК содержатся в отдельных олигонуклеотидах. Согласно другим вариантам реализации по существу комплементарные последовательности дцРНК содержатся в одном олигонуклеотиде.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1331203.1; AD-1331206.1; AD-1331209.1; AD-1331212.1; AD-1331213.1; AD-1331329.1; AD-1331237.1; AD-1331238.1; AD-1331240.1; AD-1331244.1; AD-1331256.1; AD-1331262.1; AD-1331264.1; AD-1331265.1; AD-1331266.1; AD-1331316.1; и AD-1331338.1.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1331203.1; AD-1331206.1; AD-1331209.1; AD-1331212.1; AD-1331213.1; AD-1331329.1; AD-1331240.1; AD-1331262.1; AD-1331264.1; AD-1331265.1 и AD-1331266.1.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1331203.1; AD-1331206.1; AD-1331209.1; AD-1331212.1; и AD-1331213.1.

Следует понимать, что, хотя последовательности, например, в Таблице 3, не описаны как модифицированные или конъюгированные последовательности, РНК в случае иРНК согласно настоящему изобретению, например, дцРНК согласно настоящему изобретению, может содержать любую из последовательностей, изложенных в любой из Таблиц 2-3 и 7-8, которая является немодифицированной, неконъюгированной или модифицированной или конъюгированной отличным образом от последовательностей, описанных в таблицах. Другими словами, настоящее изобретение включает дцРНК из Таблиц 2-3 и 7-8, которые являются немодифицированными, неконъюгированными, модифицированными или конъюгированными, как описано в настоящем документе.

Специалисту в данной области техники будет хорошо известно, что дцРНК, имеющие дуплексную структуру из примерно 20-23 пар оснований, например, 21 пару

оснований, были хорошо приняты как особенно эффективные в индукции РНК-интерференции (Elbashir *et al.*, *EMBO* 2001, 20:6877-6888). Однако другие обнаружили, что более короткие или более длинные дуплексные структуры РНК также могут быть эффективными (Chu and Rana (2007) *RNA* 14:1714-1719; Kim *et al.* (2005) *Nat Biotech* 23:222-226). В вариантах реализации, описанных выше, в силу природы олигонуклеотидных последовательностей, предложенных в любой из Таблиц 2-3 и 7-8, дцРНК, описанные в настоящем документе, могут включать по меньшей мере одну цепь длиной минимум 21 нуклеотид. Можно обоснованно ожидать, что более короткие дуплексы, имеющие любую из последовательностей в любой из Таблиц 2-3 и 7-8, за исключением только нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, могут обладать близкой эффективностью в сравнении с дцРНК, описанными выше. Следовательно, предусмотрено, что дцРНК, имеющие последовательность из по меньшей мере 19, 20 или более последовательных нуклеотидов, полученных из любой из последовательностей в любой из Таблиц 2-3 и 7-8, и отличающиеся по своей способности ингибировать экспрессию гена ANGPTL3 не более чем на примерно 5, 10, 15, 20, 25 или 30% от ингибирования дцРНК, содержащей полную последовательность, включены в объем настоящего изобретения.

Кроме того, РНК, приведенные в Таблицах 2-3 и 7-8, идентифицируют сайт(ы) в транскрипте ANGPTL3, который(ые) является(являются) восприимчивым(и) к RISC-опосредуемому расщеплению. Таким образом, согласно настоящему изобретению дополнительно охарактеризованы иРНК, которые нацелены в пределах одного из этих сайтов. В настоящем документе считается, что агент иРНК нацелен в пределах конкретного сайта транскрипта РНК, если иРНК способствует расщеплению транскрипта в любом месте в пределах данного конкретного сайта. Такая иРНК обычно будет включать по меньшей мере примерно 19 непрерывных нуклеотидов из любой из последовательностей, представленных в любой из Таблиц 2-3 и 7-8, соединенных с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из области, смежной с выбранной последовательностью в гене ANGPTL3.

III. Модифицированные иРНК согласно настоящему изобретению

Согласно определенным вариантам реализации РНК в случае иРНК согласно настоящему изобретению, например, дцРНК, не модифицирована и не содержит, например, химических модификаций или конъюгаций, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе. Согласно другим вариантам реализации РНК в случае иРНК согласно настоящему изобретению, например, дцРНК, химически модифицирована для повышения стабильности или других благоприятных характеристик. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения по существу все нуклеотиды иРНК согласно настоящему изобретению модифицированы. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения все нуклеотиды иРНК или по существу все нуклеотиды иРНК модифицированы, т. е. в цепи иРНК присутствует не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида.

Нуклеиновые кислоты, охарактеризованные в настоящем изобретении, можно синтезировать или модифицировать с помощью способов, хорошо установленных в данной области техники, таких как описанные в источнике «Current protocols in nucleic acid chemistry», Beaucage, S.L. *et al.* (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, который включен в настоящий документ посредством ссылки. Модификации включают, например, концевые модификации, например, 5'-концевые модификации (фосфорилирование, конъюгацию, инвертированные связи) или 3'-концевые модификации (конъюгирование, ДНК-нуклеотиды, инвертированные связи, и т. д.); модификации оснований, например, замену стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями, или основаниями, которые спариваются с расширенным репертуаром партнеров, удаление оснований (лишенные азотистого основания нуклеотиды), или конъюгированные основания; модификации сахара (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замену сахара; или модификации остова, включая модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры соединений иРНК, которые можно применять в вариантах реализации, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются этим, РНК, содержащие модифицированные остовы или не содержащие природных межнуклеозидных связей. РНК, имеющие модифицированные остовы, включают, помимо прочего, РНК, не содержащие атома фосфора в остове. Для целей настоящего описания и как иногда упоминается в данной области техники, модифицированные РНК, которые не имеют атома фосфора в их межнуклеозидном остове, также можно считать олигонуклеозидами. Согласно некоторым вариантам реализации модифицированная иРНК будет иметь атом фосфора в своем межнуклеозидном остове.

Модифицированные остовы РНК включают, например, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфодитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидаты и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тиоалкилфосфонаты, тиоалкилфосфотриэфиры, и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5'-связи, их 2'-5'-связанные аналоги, и те, которые имеют инвертированную полярность, при которой смежные пары нуклеозидных звеньев соединены 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению находятся в форме свободной кислоты. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению находятся в форме соли. Согласно одному варианту реализации агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению находятся в форме соли натрия. Согласно определенным вариантам реализации, если агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению находятся в форме соли натрия, ионы натрия присутствуют в указанном агенте в качестве противоионов по существу для всех фосфодиэфирных и/или фосфотиоатных групп, присутствующих в указанном агенте.

Агенты, в которых по существу все из фосфодиэфирных и/или фосфотиоатных связей имеют противоион натрия, включают не более 5, 4, 3, 2 или 1 фосфодиэфирной и/или фосфотиоатной связи без противоиона натрия. Согласно некоторым вариантам реализации, если агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению находятся в форме соли натрия, ионы натрия присутствуют в указанном агенте в качестве противоионов для всех фосфодиэфирных и/или фосфотиоатных групп, присутствующих в указанном агенте.

Типичные патенты США, в которых раскрыто получение упомянутых выше фосфоросодержащих связей, включают, но не ограничиваются перечисленными, патенты США №№ 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177195; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541316; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361; 5625050; 6028188; 6124445; 6160109; 6169170; 6172209; 6239265; 6277603; 6326199; 6346614; 6444423; 6531590; 6534639; 6608035; 6683167; 6858715; 6867294; 6878805; 7015315; 7041816; 7273933; 7321029; и патент США RE39464, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Модифицированные остовы РНК, которые не включают в себя атом фосфора, имеют остовы, которые образованы короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомными и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями или одной или более короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. К ним относятся те, которые имеют морфолиновые связи (частично образованные из сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы, сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы; содержащие алкены остовы; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленигидразиновые основы; сульфонатные и сульфонамидные основы; амидные остовы; и другие, имеющие смешанные составные части N, O, S и CH₂.

Типичные патенты США, в которых раскрыто получение упомянутых выше олигонуклеозидов, включают, но не ограничиваются перечисленными, патенты США №№ 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 564562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677; 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5608046; 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437; и 5677439, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Для применения в иРНК, предложенных в настоящем документе, предусмотрены подходящие миметики РНК, в которых как сахар, так и межнуклеозидная связь, т. е. остов, нуклеотидных звеньев заменены новыми группами. Звенья оснований сохраняют для гибридизации с подходящим целевым соединением нуклеиновой кислоты. Одно такое олигомерное соединение, в котором миметик РНК, который, как было показано, обладает превосходными свойствами гибридизации, называется пептидной нуклеиновой кислотой (PNA). В соединениях PNA сахарный остов РНК заменен амидосодержащим остовом, в частности, аминоэтилглициновым остовом. Нуклеиновые основания сохранены и связаны,

непосредственно или опосредованно, с аза-атомами азота амидной части остова. Типичные патенты США, в которых раскрыто получение соединений PNA, включают, но не ограничиваются перечисленными, патенты США №№ 5539082; 5714331 и 5719262, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Дополнительные соединения PNA, подходящие для применения в иРНК согласно настоящему изобретению, описаны, например, в Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты реализации, охарактеризованные в настоящем изобретении, включают РНК с фосфотиоатными остовами и олигонуклеозиды с гетероатомными остовами, и, в частности, $--CH_2--NH--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--$ [известный как метиленовый (метилямино) остов или остов ММІ], $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--$ и $--N(CH_3)--CH_2--CH_2--$ из упомянутого выше патента США № 5489677, и амидные остовы из упомянутого выше патента США № 5602240. Согласно некоторым вариантам реализации РНК, охарактеризованные в настоящем документе, имеют структуры морфолинового остова из вышеупомянутого патента США № 5034506. Нативный фосфодиэфирный остов может быть представлен как $O-P(O)(OH)-OCH_2-$.

Модифицированные РНК также могут содержать один или более замещенных сахарных фрагментов. иРНК, например, дцРНК, охарактеризованные в настоящем документе, могут включать одно из следующих в 2'-положении: OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил; или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут представлять собой замещенный или незамещенный C_1-C_{10} алкил или C_2-C_{10} алкенил и алкинил. Примерные подходящие модификации включают $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$ и $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, где n и m находятся в диапазоне от 1 до примерно 10. Согласно другим вариантам реализации дцРНК включают одно из следующих в 2'-положении: C_1-C_{10} низший алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминокламино, полиалкиламино, замещенный силил, РНК-расщепляющую группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств иРНК, или группу для улучшения фармакодинамических свойств иРНК, и другие заместители, имеющие подобные свойства. Согласно некоторым вариантам реализации модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), т. е. группу алкокси-алкокси. Другая примерная модификация представляет собой 2'-диметиламинооксиэтокси, т. е. группу $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, также известную как 2'-DMAOE, описанную в примерах в настоящем документе ниже, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известную в данной области техники как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), т. е., 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₃)₂. Дополнительные примерные модификации включают: 5'-Me-2'-F-нуклеотиды, 5'-Me-2'-OMe-нуклеотиды, 5'-Me-2'-дезоксинуклеотиды (как R-изомеры, так и S-изомеры в этих трех семействах); 2'-алкоксиалкил и 2'-NMA (N-метилацетамид).

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH₃), 2'-аминопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) и 2'-фтор (2'-F). Подобные модификации также можно вносить в других положениях на РНК в случае иРНК, в частности, в 3'-положении сахара на 3'-концевом нуклеотиде или в 2'-5'-связанных дцРНК и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. иРНК также могут иметь миметики сахара, такие как циклобутиловые фрагменты, вместо пентофуранозилового сахара. Типичные патенты США, в которых раскрыто получение таких модифицированных структур сахара, включают, но не ограничиваются перечисленными, патенты США №№ 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633; и 5700920, некоторые из которых находятся в общем владении с настоящей заявкой. Полное содержание каждого из упомянутых выше документов тем самым включено в настоящий документ посредством ссылки.

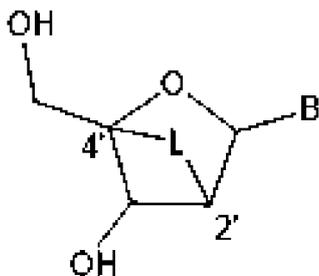
иРНК также может включать модификации или замены нуклеинового основания (часто называемого в данной области техники просто как «основание»). В настоящем документе «немодифицированные» или «природные» нуклеиновые основания включают пуриновые основания аденин (A) и гуанин (G), и пиримидиновые основания тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные нуклеиновые основания включают другие синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как дезокситимидин (dT), 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галоурацил и -цитозин, 5-пропинилурацил и -цитозин, 6-азоурацил, -цитозин и -тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-гало, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-гало, в частности, 5-бром, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-дезааденин, 3-деазагуанин и 3-дезааденин. Дополнительные нуклеиновые основания включают раскрытые в патенте США № 3687808, раскрытые в *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; раскрытые в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, pages 858-859, Kroschwitz, J. L., ed. John Wiley & Sons, 1990, раскрытые Englisch *et al.*, *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613, и раскрытые Sanghvi, Y S., Chapter 15, *dsRNA Research and Applications*, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из этих нуклеиновых оснований особенно применимы для повышения аффинности связывания олигомерных соединений, охарактеризованных в настоящем изобретении. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и 0-6 замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что 5-метилцитозиновые замены увеличивают стабильность дуплекса нуклеиновых кислот на 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., *dsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)

и представляют собой примерные замены оснований, еще более конкретно при комбинировании с 2'-О-метоксиэтильными модификациями сахара.

Типичные патенты США, в которых раскрыто получение некоторых из упомянутых выше модифицированных нуклеиновых оснований, а также других модифицированных нуклеиновых оснований, включают, но не ограничиваются перечисленными, упомянутые выше патенты США №№ 3687808, 4845205; 513030; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121, 5596091; 5614617; 5681941; 5750692; 6015886; 6147200; 6166197; 6222025; 6235887; 6380368; 6528640; 6639062; 6617438; 7045610; 7427672; и 7495088, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению также можно модифицировать для включения одного или более бициклических сахарных фрагментов. «Бициклический сахар» представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное кольцом, образованным путем образования мостика между двумя углеродами, будь то смежными или не смежными. «Бициклический нуклеозид» («BNA») представляет собой нуклеозид, содержащий сахарный фрагмент, содержащий кольцо, образованное путем образования мостика между двумя углеродами, будь то смежными или не смежными, сахарного кольца с образованием тем самым бициклической кольцевой системы. Согласно определенным вариантам реализации мостик соединяет 4'-углерод и 2'-углерод сахарного кольца, необязательно посредством 2'-ациклического атома кислорода. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации агент согласно настоящему изобретению может включать одну или более блокированных нуклеиновых кислот (LNA). Блокированная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, имеющий модифицированный фрагмент рибозы, в котором фрагмент рибозы содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-углероды. Другими словами, LNA представляет собой нуклеотид, содержащий бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH₂-O-2'. Эта структура эффективно «блокирует» рибозу в 3'-эндо структурной конформации. Было показано, что добавление блокированных нуклеиновых кислот к кРНК повышает стабильность кРНК в сыворотке крови и снижает нецелевые эффекты (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). Примеры бициклических нуклеозидов для применения в полинуклеотидах согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, нуклеозиды, содержащие мостик между 4'- и 2'-атомами рибозильного кольца. Согласно определенным вариантам реализации антисмысловые полинуклеотидные агенты согласно настоящему изобретению включают один или более бициклических нуклеозидов, содержащих мостик 4'-2'.

Блокированный нуклеозид может быть представлен структурой (не учитывая стереохимию),



где В представляет собой нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание, и L представляет собой связывающую группу, которая соединяет 2'-углерод с 4'-углеродом рибозного кольца. Примеры таких 4'-2'-мостиковых бициклических нуклеозидов, включают, но не ограничиваются перечисленными, 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (также называемый «ограниченным этилом» или «сEt») и 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (и его аналоги; см. например, патент США № 7399845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278283); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278425); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (см., например, публикацию патента США № 2004/0171570); 4'-CH₂-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C1-C12-алкил, или защитную группу для атома азота (см., например, патент США № 7427672); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (см., например, Chattopadhyaya *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); и 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278426). Полное содержание каждого из упомянутых выше документов тем самым включено в настоящий документ посредством ссылки.

Дополнительные типичные патенты США и публикации патентов США, в которых раскрыто получение блокированных нуклеотидов нуклеиновой кислоты, включают, но не ограничиваются перечисленными, следующие: патенты США №№ 6268490; 6525191; 6670461; 6770748; 6794499; 6998484; 7053207; 7034133; 7084125; 7399845; 7427672; 7569686; 7741457; 8022193; 8030467; 8278425; 8278426; 8278283; US 2008/0039618; и US 2009/0012281, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Может быть получен любой из вышеупомянутых бициклических нуклеозидов, имеющий одну или более стереохимических конфигураций сахара, включая, например, α-L-рибофуранозу и β-D-рибофуранозу (см. WO 99/14226).

РНК в случае иРНК также может быть модифицирована для включения одного или более ограниченных этилнуклеотидов. В настоящем документе термин «ограниченный этилнуклеотид» или «сEt» представляет собой блокированную нуклеиновую кислоту, содержащую бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH(CH₃)-O-2' (т. е. L в предыдущей структуре). Согласно одному варианту реализации ограниченный этилнуклеотид находится в S-конформации, называемой в настоящем документе «S-сEt».

иРНК согласно настоящему изобретению также может включать один или более «конформационно ограниченных нуклеотидов» («CRN»). CRN представляют собой аналоги нуклеотидов с линкером, соединяющим C2' и C4'-углероды рибозы или C3 и -C5'-углероды рибозы. CRN блокируют рибозное кольцо в стабильной конформации и

повышают аффинность гибридизации с мРНК. Линкер имеет достаточную длину для размещения кислорода в оптимальном положении для стабильности и аффинности, что приводит к меньшему «сморщиванию» рибозного кольца.

Типичные публикации, в которых раскрыто получение некоторых из упомянутых выше CRN, включают, но не ограничиваются перечисленными, публикацию патента США № 2013/0190383; и РСТ публикацию WO 2013/036868, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации иРНК согласно настоящему изобретению содержит один или более мономеров, которые представляют собой нуклеотиды UNA (неблокированные нуклеиновые кислоты). UNA представляет собой неблокированную ациклическую нуклеиновую кислоту, в которой любая из связей сахара была удалена с образованием неблокированного «сахарного» остатка. В одном примере UNA также включает мономер, в котором удалены связи между C1'-C4' (т. е. ковалентная связь углерод-кислород-углерод между C1'- и C4'-углеродами). В другом примере связь C2'-C3' сахара (т. е. ковалентная связь углерод-углерод между C2'- и C3'-углеродами) была удалена (см. *Nuc. Acids Symp. Series*, 52, 133-134 (2008) и *Fluiter et al., Mol. Biosyst.*, 2009, 10, 1039, которые включены в настоящий документ посредством ссылки).

Типичные публикации США, в которых раскрыто получение UNA, включают, но не ограничиваются перечисленными, патент США № 8314227; и публикации патентов США №№ 2013/0096289; 2013/0011922; и 2011/0313020, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Потенциально стабилизирующие модификации на концах молекул РНК могут включать N-(ацетиламинокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-NHAc), N-(капроил-4-гидроксипролинол (Нур-С6), N-(ацетил-4-гидроксипролинол (Нур-NHAc), тимидин-2'-О-дезокситимидин (простой эфир), N-(аминокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-амино), 2-докозаноилуридин-3'-фосфат, инвертированный 2'-дезоксидифицированный рибонуклеотид, такой как инвертированный dT(idT), инвертированный dA (idA), инвертированный лишенный азотистого основания 2'-дезоксидифицированный рибонуклеотид (iAb) и другие. Раскрытие этой модификации можно найти в WO 2011/005861.

В одном примере 3'- или 5'-конец олигонуклеотида связан с инвертированным 2'-дезоксидифицированным рибонуклеотидом, таким как инвертированный dT(idT), инвертированный dA (idA) или инвертированный лишенный азотистого основания 2'-дезоксидифицированный рибонуклеотид (iAb). В одном конкретном примере инвертированный 2'-дезоксидифицированный рибонуклеотид связан с 3'-концом олигонуклеотида, таким как 3'-конец смысловой цепи, описанной в настоящем документе, причем указанная связь происходит посредством 3'-3'-фосфодиэфирной связи или 3'-3'-фосфотиоатной связи.

В другом примере 3'-конец смысловой цепи связан посредством 3'-3'-фосфотиоатной связи с инвертированным лишенным азотистого основания рибонуклеотидом (iAb). В другом примере 3'-конец смысловой цепи связан посредством 3'-3'-фосфотиоатной связи с инвертированным dA (idA).

В одном конкретном примере инвертированный 2'-дезоксифосфорилированный рибонуклеотид связан с 3'-концом олигонуклеотида, таким как 3'-конец смысловой цепи, описанной в настоящем документе, причем указанная связь происходит посредством 3'-3'-фосфодифосфатной связи или 3'-3'-фосфотиоатной связи.

В другом примере 3'-концевой нуклеотид смысловой цепи представляет собой инвертированный dA (idA) и связан с предыдущим нуклеотидом посредством 3'-3'-связи (например, 3'-3'-фосфотиоатной связи).

Другие модификации нуклеотидов иРНК согласно настоящему изобретению включают 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, например, 5'-концевой фосфат или миметик фосфата на антисмысловой цепи иРНК. Подходящие миметики фосфата раскрыты, например, в публикации патента США № 2012/0157511, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

А. Модифицированные иРНК, содержащие мотивы согласно настоящему изобретению

Согласно определенным аспектам настоящего изобретения агенты на основе двухцепочечной РНК согласно настоящему изобретению включают агенты с химическими модификациями, раскрытыми, например, в WO2013/075035, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Как показано в настоящем документе и в WO2013/075035, один или более мотивов из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах могут быть введены в смысловую цепь или антисмысловую цепь агента дцРНКи, в частности, в сайте расщепления или вблизи него. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь и антисмысловая цепь агента дцРНКи в ином случае могут быть полностью модифицированы. Введение этих мотивов прерывает профиль модификации смысловой или антисмысловой цепи, если он присутствует. Агент дцРНКи может быть необязательно конъюгирован с таким лигандом как производное GalNAc, например, на смысловой цепи.

Более конкретно, если смысловая цепь и антисмысловая цепь агента на основе двухцепочечной РНК полностью модифицированы так, чтобы иметь один или более мотивов из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления или рядом с ним по меньшей мере одной цепи агента дцРНКи, наблюдали активность сайленсинга гена агента дцРНКи.

Соответственно, согласно настоящему изобретению предложены агенты на основе двухцепочечной РНК, способные ингибировать экспрессию целевого гена (т. е. гена ANGPTL3) *in vivo*. Агент РНКи содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь. Каждая цепь агента РНКи может иметь, например, 17-30 нуклеотидов в длину, 25-30 нуклеотидов в длину, 27-30 нуклеотидов в длину, 19-25 нуклеотидов в длину, 19-23 нуклеотида в длину, 19-21 нуклеотид в длину, 21-25 нуклеотидов в длину или 21-23 нуклеотида в длину.

Смысловая цепь и антисмысловая цепь, как правило, образуют дуплексную двухцепочечную РНК («дцРНК»), также называемую в настоящем документе «агент дцРНКи». Двухцепочечная область агента дцРНКи может независимо представлять собой,

например, дуплексную область, которая может иметь 27-30 нуклеотидных пар в длину, 19-25 нуклеотидных пар в длину, 19-23 нуклеотидные пары в длину, 19-21 нуклеотидную пару в длину, 21-25 нуклеотидных пар в длину или 21-23 нуклеотидные пары в длину. В другом примере дуплексная область выбрана из 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 нуклеотидов в длину.

Согласно определенным вариантам реализации агент дцРНКи может содержать одну или более областей липких концов или кэпирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах одной или обеих цепей. Липкий конец может независимо представлять собой 1-6 нуклеотидов в длину, например, 2-6 нуклеотидов в длину, 1-5 нуклеотидов в длину, 2-5 нуклеотидов в длину, 1-4 нуклеотида в длину, 2-4 нуклеотида в длину, 1-3 нуклеотида в длину, 2-3 нуклеотида в длину или 1-2 нуклеотида в длину. Согласно определенным вариантам реализации липкие концы могут включать удлиненные липкие концы, как предусмотрено выше. Липкие концы могут быть получены в результате того, что одна цепь длиннее другой, или в результате того, что две цепи одинаковой длины расположены в шахматном порядке. Липкий конец может образовывать несовпадение с целевой мРНК или он может быть комплементарным генным последовательностям, которые являются мишенями, или может представлять собой другую последовательность. Первая и вторая цепи также могут быть соединены, например, с помощью дополнительных оснований с образованием шпильки или с помощью других линкеров, не содержащих оснований.

Согласно определенным вариантам реализации каждый из нуклеотидов в области липкого конца агента дцРНКи может независимо представлять собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, включая, но не ограничиваясь перечисленными, 2'-модифицированный сахар, такой как 2'-F, 2'-O-метил, тимидин (Т), 2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин (Тео), 2'-O-метоксиэтиладенозин (Аео), 2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин (m5Ceo) и любые их комбинации.

Например, ТТ может представлять собой последовательность липкого конца для любого конца на любой цепи. Липкий конец может образовывать несовпадение с целевой мРНК или он может быть комплементарным генным последовательностям, которые являются мишенями, или может представлять собой другую последовательность.

5'-или 3'-липкие концы на смысловой цепи, антисмысловой цепи или на обеих цепях агента дцРНКи могут быть фосфорилированы. Согласно некоторым вариантам реализации область(области) липкого конца содержит(ат) два нуклеотида, имеющих фосфотиоат между двумя нуклеотидами, причем указанные два нуклеотида могут быть одинаковыми или разными. Согласно некоторым вариантам реализации липкий конец присутствует на 3'-конце смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепей. Согласно некоторым вариантам реализации указанный 3'-липкий конец присутствует в антисмысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации указанный 3'-липкий конец присутствует в смысловой цепи.

Агент дцРНКи может содержать только один липкий конец, который может усиливать интерференционную активность РНКи, не влияя на ее общую стабильность.

Например, одноцепочечной липкий конец может быть расположен на 3'-конце смысловой цепи или, в качестве альтернативы, на 3'-конце антисмысловой цепи. РНКи также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой цепи (т.е. 3'-конце смысловой цепи) или наоборот. Обычно антисмысловая цепь агента дцРНКи имеет нуклеотидный липкий конец на 3'-конце, и 5'-конец является тупым. Не ограничиваясь какой-либо теорией, асимметричный тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи и 3'-концевой липкий конец антисмысловой цепи способствуют загрузке направляющей цепи в процесс RISC.

Согласно определенным вариантам реализации агент дцРНКи имеет оба тупых конца и содержит 19 нуклеотидов в длину, причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 7, 8, 9 с 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12 и 13 с 5'-конца.

Согласно другим вариантам реализации агент дцРНКи имеет оба тупых конца и содержит 20 нуклеотидов в длину, причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 8, 9 и 10 с 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12 и 13 с 5'-конца.

Согласно другим вариантам реализации агент дцРНКи имеет оба тупых конца и содержит 21 нуклеотид в длину, причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10 и 11 с 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12 и 13 с 5'-конца.

Согласно определенным вариантам реализации агент дцРНКи содержит 21-нуклеотидную смысловую цепь и 23-нуклеотидную антисмысловую цепь, причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10 и 11 с 5'-конца; указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12 и 13 с 5'-конца, при этом один конец агента РНКи является тупым, в то время как другой конец содержит 2-нуклеотидный липкий конец. Согласно одному варианту реализации 2-нуклеотидный липкий конец находится на 3'-конце антисмысловой цепи.

Если 2-нуклеотидный липкий конец находится на 3'-конце антисмысловой цепи, могут существовать две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами, причем два из трех нуклеотидов представляют собой нуклеотиды липкого конца, и третий нуклеотид представляет собой спаренный нуклеотид рядом с нуклеотидом липкого конца. Согласно одному варианту реализации агент РНКи дополнительно

содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5'-конце смысловой цепи, так и на 5'-конце антисмысловой цепи. Согласно определенным вариантам реализации каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи агента дцРНКи, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов, представляет собой модифицированный нуклеотид. Согласно определенным вариантам реализации каждый остаток независимо модифицирован с использованием 2'-О-метила или 3'-фтора, например, в чередующемся мотиве. Необязательно агент дцРНКи дополнительно содержит лиганд (такой как GalNAc₃).

Согласно определенным вариантам реализации агент дцРНКи содержит смысловую и антисмысловую цепь, причем указанная смысловая цепь представляет собой 25-30 нуклеотидных остатков в длину, причем, начиная с 5'-концевого нуклеотида (положение 1), положения 1-23 первой цепи содержат по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; указанная антисмысловая цепь представляет собой 36-66 нуклеотидных остатков в длину и, начиная с 3'-концевого нуклеотида, содержит по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1-23 смысловой цепи с образованием дуплекса; при этом по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой цепи не спарен со смысловой цепью, и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов не спарены со смысловой цепью с образованием тем самым одноцепочечного 3'-липкого конца из 1-6 нуклеотидов; при этом 5'-конец антисмысловой цепи содержит 10-30 последовательных нуклеотидов, которые не спарены со смысловой цепью, с образованием тем самым одноцепочечного 5'-липкого конца из 10-30 нуклеотидов; при этом по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой цепи спарены с нуклеотидами антисмысловой цепи, если смысловая и антисмысловая цепи выравнены для обеспечения максимальной комплементарности, с образованием тем самым по существу дуплексной области между смысловой и антисмысловой цепями; и антисмысловая цепь является достаточно комплементарной целевой РНК вдоль по меньшей мере 19 рибонуклеотидов по длине антисмысловой цепи для снижения экспрессии целевого гена при введении двухцепочечной нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах, при этом по меньшей мере один из мотивов возникает в сайте расщепления или рядом с ним. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления или рядом с ним.

Согласно определенным вариантам реализации агент дцРНКи содержит смысловую и антисмысловую цепи, причем указанный агент дцРНКи содержит первую цепь, имеющую длину, которая составляет по меньшей мере 25 и не более 29 нуклеотидов, и вторую цепь, имеющую длину, которая составляет не более 30 нуклеотидов, с по меньшей мере одним мотивом из трех 2'-О-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положении 11, 12, 13 с 5'-конца; при этом 3'-конец первой цепи и 5'-конец второй цепи образуют тупой конец, и вторая цепь длиннее на 1-4 нуклеотида на своем 3'-конце, чем

первая цепь, при этом указанная дуплексная область представляет собой по меньшей мере 25 нуклеотидов в длину, и вторая цепь является достаточно комплементарной целевой мРНК вдоль по меньшей мере 19 нуклеотидов по длине второй цепи для снижения экспрессии целевого гена при введении агента РНКи в клетку млекопитающего, и при этом расщепление Dicer агента дцРНКи приводит к образованию киРНК, содержащей 3'-конец второй цепи, что снижает экспрессию целевого гена у млекопитающего. Необязательно агент дцРНКи дополнительно содержит лиганд.

Согласно определенным вариантам реализации смысловая цепь агента дцРНКи содержит по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, причем один из мотивов возникает в сайте расщепления в смысловой цепи.

Согласно определенным вариантам реализации антисмысловая цепь агента дцРНКи также может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, причем один из мотивов возникает в сайте расщепления или рядом с ним в антисмысловой цепи.

В случае агента дцРНКи, имеющего дуплексную область из 19-23 нуклеотидов в длину, сайт расщепления антисмысловой цепи, как правило, находится около 10, 11 и 12 положений с 5'-конца. Таким образом, мотивы из трех идентичных модификаций могут возникать в 9, 10, 11 положениях; 10, 11, 12 положениях; 11, 12, 13 положениях; 12, 13, 14 положениях; или 13, 14, 15 положениях антисмысловой цепи, при этом отсчет начинается с первого нуклеотида с 5'-конца антисмысловой цепи, или отсчет начинается с первого спаренного нуклеотида в пределах дуплексной области с 5'-конца антисмысловой цепи. Сайт расщепления в антисмысловой цепи также может изменяться в соответствии с длиной дуплексной области агента дцРНКи с 5'-конца.

Смысловая цепь агента дцРНКи может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления указанной цепи; и антисмысловая цепь может иметь по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления указанной цепи или рядом с ним. Если смысловая цепь и антисмысловая цепь образуют дуплекс дцРНК, смысловая цепь и антисмысловая цепь могут быть выравнены так, что один мотив из трех нуклеотидов на смысловой цепи и один мотив из трех нуклеотидов на антисмысловой цепи имеют по меньшей мере однонуклеотидное перекрытие, т. е. по меньшей мере один из трех нуклеотидов мотива в смысловой цепи образует пару оснований по меньшей мере с одним из трех нуклеотидов мотива в антисмысловой цепи. В качестве альтернативы, по меньшей мере два нуклеотида могут перекрываться, или все три нуклеотида могут перекрываться.

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь агента дцРНКи может содержать более одного мотива из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах. Первый мотив может возникать в сайте расщепления цепи или вблизи него, и другие мотивы могут представлять собой модификацию «крыла».

Термин «модификация крыла» в настоящем документе относится к мотиву, возникающему в другой части цепи, которая отделена от мотива в сайте расщепления или вблизи него той же цепи. Модификация «крыла» либо прилегает к первому мотиву, либо отделена по меньшей мере одним или более нуклеотидами. Если мотивы являются непосредственно смежными друг с другом, то химические структуры мотивов отличаются друг от друга, и если мотивы разделены одним или более нуклеотидами, химические структуры могут быть одинаковыми или разными. Могут присутствовать две или более модификаций «крыла». Например, при наличии двух модификаций «крыла» каждая модификация «крыла» может возникать на одном конце относительно первого мотива, который находится в сайте расщепления или вблизи него, или по обеим сторонам от основного мотива.

Как и смысловая цепь, антисмысловая цепь агента дцРНКи может содержать более одного мотива из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, при этом по меньшей мере один из мотивов возникает в сайте расщепления указанной цепи или вблизи него. Указанная антисмысловая цепь также может содержать одну или более модификаций «крыла», расположение которых сходно с модификациями «крыла», которые могут присутствовать на смысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации модификация «крыла» на смысловой цепи или антисмысловой цепи агента дцРНКи, как правило, не включает один или два первых концевых нуклеотида на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах цепи.

Согласно другим вариантам реализации модификация «крыла» на смысловой цепи или антисмысловой цепи агента дцРНКи, как правило, не включает один или два первых спаренных нуклеотида в пределах дуплексной области на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах цепи.

Если каждая из смысловой цепи и антисмысловой цепи агента дцРНКи содержит по меньшей мере одну модификацию «крыла», то модификации «крыла» могут попадать на один и тот же конец дуплексной области и могут иметь перекрывание одного, двух или трех нуклеотидов.

Если каждая из смысловой цепи и антисмысловой цепи агента дцРНКи содержит по меньшей мере две модификации «крыла», смысловая цепь и антисмысловая цепь могут быть настолько выравнены, что две модификации, каждая из одной цепи, приходятся на один конец дуплексной области с перекрыванием одного, двух или трех нуклеотидов; две модификации, каждая из одной цепи, приходятся на другой конец дуплексной области с перекрыванием одного, двух или трех нуклеотидов; две модификации одной цепи приходятся на каждую сторону основного мотива с перекрыванием одного, двух или трех нуклеотидов в дуплексной области.

Согласно некоторым вариантам реализации каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи агента дцРНКи, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов, может быть модифицирован. Каждый нуклеотид может быть модифицирован одинаковой или разной модификацией, которая может включать одно или более изменений одного или обоих несвязывающих кислородов фосфата или одного или более связывающих

кислородов фосфата; изменение компонента рибозного сахара, например, 2'-гидроксила на рибозном сахаре; полную замену фосфатного фрагмента «дефосфо»-линкерами; модификацию или замену встречающегося в природе основания; и замену или модификацию остова рибоза-фосфат.

Поскольку нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры из субъединиц, многие из модификаций возникают в положении, которое повторяется в пределах нуклеиновой кислоты, например, модификация основания или фосфатного фрагмента, или несвязывающего О фосфатного фрагмента. В некоторых случаях модификация будет возникать во всех рассматриваемых положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях не возникнет. В качестве примера модификация может возникать только в 3'- или 5'-концевом положении, может возникать только в концевой области, например, в положении на концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи. Модификация может возникать в двухцепочечной области, в одноцепочечной области или в обеих областях. Модификация может возникать только в двухцепочечной области РНК или может возникать только в одноцепочечной области РНК. Например, фосфотиоатная модификация в положении несвязывающего О может возникать только на одном или на обоих концах, может возникать только в концевой области, например, в положении на концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи, или может возникать в двухцепочечной и одноцепочечной областях, в частности, на концах. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированы.

Можно, например, повысить стабильность, включить конкретные основания в липкие концы или включить модифицированные нуклеотиды или суррогаты нуклеотидов в одноцепочечные липкие концы, например, в 5'-или 3'-липкий конец или в оба конца. Например, может быть желательным включение пуриновых нуклеотидов в липкие концы. Согласно некоторым вариантам реализации все или некоторые основания в 3'- или 5'-липком конце могут быть модифицированы, например, с помощью модификации, описанной в настоящем документе. Модификации могут включать, например, применение модификаций в 2'-положении сахара рибозы с модификациями, известными в данной области техники, например, применение дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезоксидеокси-2'-фтор- (2'-F) или 2'-О-метил-модифицированных, вместо рибозного сахара нуклеинового основания, и модификаций в фосфатной группе, например, фосфотиоатных модификаций. Липкие концы не обязательно должны быть гомологичны целевой последовательности.

Согласно некоторым вариантам реализации каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован с использованием LNA, CRN, сЕТ, UNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтил, 2'-О-метил, 2'-О-аллил, 2'-С-аллил, 2'-дезоксидеокси, 2'-гидрокси или 2'-фтор. Цепи могут содержать более одной модификации. Согласно одному варианту реализации каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован с использованием 2'-О-метил или 2'-фтор.

По меньшей мере две различные модификации, как правило, присутствуют на смысловой цепи и антисмысловой цепи. Эти две модификации могут представлять собой 2'-О-метил или 2'-фтор-модификации или другие.

Согласно определенным вариантам реализации N_a или N_b содержат модификации в чередующемся порядке. Термин «чередующийся мотив» в контексте настоящего документа относится к мотиву, имеющему одну или более модификаций, при этом каждая модификация возникает на чередующихся нуклеотидах одной цепи. Чередующийся нуклеотид может относиться к одному из каждого второго нуклеотида или к одному из каждых трех нуклеотидов или к подобному порядку. Например, если каждый из А, В и С представляет собой один тип модификации нуклеотида, чередующийся мотив может представлять собой «АВАВАВАВАВАВ...», «ААВВААВВААВВ...», «ААВААВААВААВ...», «АААВАААВАААВ...», «АААВВВВВВВВВ...», или «АВСАВСАВСАВС...», и т. д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или различным. Например, если каждый из А, В, С, D представляет собой один тип модификации на нуклеотиде, то порядок чередования, т. е. модификации на каждом втором нуклеотиде могут быть одинаковыми, но каждая из смысловой цепи или антисмысловой цепи может быть выбрана из нескольких возможностей модификаций в пределах чередующегося мотива, такого как «АВАВАВ...», «АСАСАС...» «ВДВДВД...» или «СДСДСД...», и т. д.

Согласно некоторым вариантам реализации агент дцРНКи согласно настоящему изобретению имеет сдвиг профиля модификации для чередующегося мотива на смысловой цепи относительно профиля модификации для чередующегося мотива на антисмысловой цепи. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой цепи соответствует по-иному модифицированной группе нуклеотидов антисмысловой цепи и наоборот. Например, при спаривании смысловой цепи с антисмысловой цепью в дуплексе дцРНК чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «АВАВАВ» от 5' к 3' цепи, и чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «ВАВАВА» от 5' к 3' цепи в пределах дуплексной области. В качестве другого примера чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «ААВВААВВ» от 5' к 3' цепи, и чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «ВВААВВАА» от 5' к 3' цепи в пределах дуплексной области так, что существует полный или частичный сдвиг профилей модификаций между смысловой цепью и антисмысловой цепью.

В одном конкретном примере чередующийся мотив в смысловой цепи представляет собой «АВАВАВ» от 5' к 3' цепи, где каждый А представляет собой немодифицированный рибонуклеотид, и каждый В представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

В одном конкретном примере чередующийся мотив в смысловой цепи представляет собой «АВАВАВ» от 5' к 3' цепи, где каждый А представляет собой 2'-дезоксид-2'-фтор-

модифицированный нуклеотид, и каждый В представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

В другом конкретном примере чередующийся мотив в антисмысловой цепи представляет собой «ВАВАВА» от 3' к 5'-цепи, где каждый А представляет собой 2'-дезоксидезокси-2'-фтор-модифицированный нуклеотид, и каждый В представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

В одном конкретном примере чередующийся мотив в смысловой цепи представляет собой «АВАВАВ» от 5' к 3' цепи, и чередующийся мотив в антисмысловой цепи представляет собой «ВАВАВА» от 3' к 5' цепи, где каждый А представляет собой немодифицированный рибонуклеотид, и каждый В представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

В одном конкретном примере чередующийся мотив в смысловой цепи представляет собой «АВАВАВ» от 5' к 3' цепи, и чередующийся мотив в антисмысловой цепи представляет собой «ВАВАВА» от 3' к 5' цепи, где каждый А представляет собой 2'-дезоксидезокси-2'-фтор-модифицированный нуклеотид, и каждый В представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

Согласно некоторым вариантам реализации агент дцРНК имеет исходно сдвиг профиля чередующегося мотива 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации на смысловой цепи относительно профиля чередующегося мотива 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации на антисмысловой цепи, т. е. 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид на смысловой цепи спаривается с 2'-F-модифицированным нуклеотидом на антисмысловой цепи и наоборот. 1 положение смысловой цепи может начинаться с 2'-F-модификации, и 1 положение антисмысловой цепи может начинаться с 2'-О-метил-модификации.

Введение одного или более мотивов из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в смысловую цепь или антисмысловую цепь прерывает исходный профиль модификации, присутствующий в смысловой цепи или антисмысловой цепи. Такое прерывание профиля модификации смысловой или антисмысловой цепи путем введения одного или более мотивов из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в смысловую или антисмысловую цепь может усиливать активность сайленсинга гена в отношении целевого гена.

Согласно некоторым вариантам реализации, если мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах вводят в любую из цепей, модификация нуклеотида рядом с мотивом представляет собой модификацию, отличную от модификации мотива. Например, часть последовательности, содержащая мотив, представляет собой «...N_aYYYN_b...», где «Y» представляет собой модификацию мотива из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, и «N_a» и «N_b» представляют собой модификацию нуклеотида рядом с мотивом «YYY», которая отличается от модификации Y, и где N_a и N_b могут представлять собой одни и те же или отличающиеся модификации. В качестве альтернативы, N_a или N_b может присутствовать или отсутствовать при наличии модификации крыла.

иРНК может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Фосфотиоатная или метилфосфонатная модификация межнуклеотидной связи может возникать на любом нуклеотиде смысловой цепи, антисмысловой цепи или на обеих цепях в любом положении цепи. Например, модификация межнуклеотидной связи может возникать на каждом нуклеотиде в смысловой цепи или антисмысловой цепи; каждая модификация межнуклеотидной связи может возникать в чередующемся порядке на смысловой цепи или антисмысловой цепи; либо смысловая цепь или антисмысловая цепь могут обе содержать модификации межнуклеотидных связей в чередующемся порядке. Порядок чередования модификации межнуклеотидной связи на смысловой цепи может быть одинаковым или отличным от антисмысловой цепи, и порядок чередования модификации межнуклеотидной связи на смысловой цепи может иметь сдвиг относительно порядка чередования модификации межнуклеотидной связи на антисмысловой цепи. Согласно одному варианту реализации двухцепочечный агент РНКи содержит 6-8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и смысловая цепь содержит по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце или 3'-конце.

Согласно некоторым вариантам реализации агент дцРНКи содержит фосфотиоатную или метилфосфонатную модификацию межнуклеотидной связи в области липкого конца. Например, область липкого конца может содержать два нуклеотида, имеющих фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь между двумя нуклеотидами. Также могут быть выполнены модификации межнуклеотидных связей для связывания нуклеотидов липких концов с концевыми спаренными нуклеотидами в пределах дуплексной области. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все нуклеотиды липкого конца могут быть связаны посредством фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи, и необязательно могут существовать дополнительные фосфотиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, связывающие нуклеотид липкого конца со спаренным нуклеотидом, который находится рядом с нуклеотидом липкого конца. Например, между тремя концевыми нуклеотидами могут существовать по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, в которых два из трех нуклеотидов являются нуклеотидами липкого конца и третий представляет собой спаренный нуклеотид рядом с нуклеотидом липкого конца. Эти три концевых нуклеотида могут находиться на 3'-конце антисмысловой цепи, 3'-конце смысловой цепи, 5'-конце антисмысловой цепи или 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации 2-нуклеотидный липкий конец находится на 3'-конце антисмысловой цепи и присутствуют две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами, причем два из трех нуклеотидов представляют собой нуклеотиды липкого конца, и третий нуклеотид представляет собой спаренный нуклеотид рядом с нуклеотидом липкого конца.

Необязательно агент дцРНКи дополнительно может содержать две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5'-конце смысловой цепи, так и на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации агент дцРНКи содержит несовпадение(я) с мишенью, в пределах дуплекса, или их комбинации. Несовпадение может возникать в области липкого конца или в дуплексной области. Пару оснований можно ранжировать на основании ее склонности способствовать диссоциации или плавлению (например, на основании свободной энергии ассоциации или диссоциации конкретной пары, самый простой подход заключается в изучении пар на основе отдельной пары, хотя также можно использовать анализ следующей соседней пары или сходный анализ). С точки зрения содействия диссоциации: A:U предпочтительнее, чем G:C; G:U предпочтительнее, чем G:C; и I:C предпочтительнее, чем G:C (I=инозин). Несовпадения, например, неканонические пары или отличные от канонических пары (как описано в другом месте в настоящем документе) являются предпочтительными по сравнению с каноническими (A:T, A:U, G:C) парами; и пары, которые включают универсальное основание, являются предпочтительными по сравнению с каноническими парами.

Согласно определенным вариантам реализации агент дцРНКи содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в пределах дуплексных областей с 5'-конца антисмысловой цепи, независимо выбранную из группы: A:U, G:U, I:C, и несовпадающие пары, например, неканонические пары или отличные от канонических пары или пары, которые включают универсальное основание, чтобы способствовать диссоциации антисмысловой цепи, на 5'-конце дуплекса.

Согласно определенным вариантам реализации нуклеотид в положении 1 в пределах дуплексной области с 5'-конца в антисмысловой цепи выбран из A, dA, dU, U и dT. В качестве альтернативы, по меньшей мере одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований в пределах дуплексной области с 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU. Например, первая пара оснований в пределах дуплексной области с 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU.

Согласно другим вариантам реализации нуклеотид на 3'-конце смысловой цепи представляет собой дезокситимидин (dT), или нуклеотид на 3'-конце антисмысловой цепи представляет собой дезокситимидин (dT). Например, имеется короткая последовательность дезокситимидиновых нуклеотидов, например, два нуклеотида dT на 3'-конце смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепей.

Согласно определенным вариантам реализации последовательность смысловой цепи может быть представлена формулой (I):



где:

каждый i и j независимо представляет собой 0 или 1;

каждый p и q независимо представляет собой 0-6;

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

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

каждый n_p и n_q независимо представляет собой нуклеотид липкого конца;

причем N_b и Y не имеют одинаковой модификации; и

каждый XXX, YYY и ZZZ независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах. Согласно одному варианту реализации все YYY представляют собой 2'-F-модифицированные нуклеотиды.

Согласно некоторым вариантам реализации N_a или N_b содержит модификации в чередующемся порядке.

Согласно некоторым вариантам реализации мотив YYY возникает в сайте расщепления смысловой цепи или вблизи него. Например, если агент дцРНКи имеет дуплексную область из 17-23 нуклеотидов в длину, то мотив YYY может возникать в сайте расщепления или в непосредственной близости от него (например: может возникать в положениях 6, 7, 8; 7, 8, 9; 8, 9, 10; 9, 10, 11; 10, 11, 12; или 11, 12, 13) смысловой цепи, начиная отсчет с первого нуклеотида с 5'-конца; или необязательно начиная отсчет с первого спаренного нуклеотида в пределах дуплексной области с 5'-конца.

Согласно одному варианту реализации i представляет собой 1 и j представляет собой 0, или i представляет собой 0 и j представляет собой 1, или как i , так и j представляют собой 1. Таким образом, смысловая цепь может быть представлена следующими формулами:

$5' n_p-N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3'$ (Ib);

$5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_a-n_q 3'$ (Ic); или

$5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3'$ (Id).

Если смысловая цепь представлена формулой (Ib), N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a может независимо представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

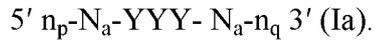
Если смысловая цепь представлена формулой (Ic), N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a может независимо представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или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

Если смысловая цепь представлена формулой (Id), каждый N_b независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Согласно одному варианту реализации N_b представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Каждый N_a может независимо представлять собой

олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

Согласно другим вариантам реализации i представляет собой 0 и j представляет собой 0, и смысловая цепь может быть представлена формулой:



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

Согласно одному варианту реализации последовательность антисмысловой цепи РНКи может быть представлена формулой (II):



где:

каждый k и l независимо представляет собой 0 или 1;

каждый p' и q' независимо представляет собой 0-6;

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

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

каждый n_p' и n_q' независимо представляет собой нуклеотид липкого конца;

причем N_b' и Y' не имеют одинаковой модификации; и

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

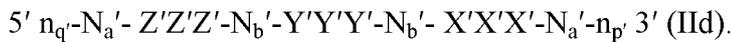
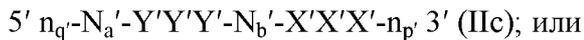
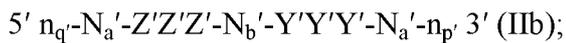
Согласно некоторым вариантам реализации N_a' или N_b' содержит модификации в чередующемся порядке.

Мотив $Y'Y'Y'$ возникает в сайте расщепления антисмысловой цепи или вблизи него. Например, если агент дцРНКи имеет дуплексную область из 17-23 нуклеотидов в длину, то мотив $Y'Y'Y'$ может возникать в положениях 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; или 13, 14, 15 антисмысловой цепи, при этом отсчет начинается с первого нуклеотида с 5'-конца; или необязательно отсчет начинается с первого спаренного нуклеотида в пределах дуплексной области с 5'-конца. Согласно одному варианту реализации мотив $Y'Y'Y'$ возникает в положениях 11, 12, 13.

Согласно определенным вариантам реализации мотив $Y'Y'Y'$ представляет собой все 2'-ОМе-модифицированные нуклеотиды.

Согласно определенным вариантам реализации k представляет собой 1 и l представляет собой 0, или k представляет собой 0 и l представляет собой 1, или как k , так и l представляют собой 1.

Таким образом, антисмысловая цепь может быть представлена следующими формулами:

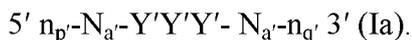


Если антисмысловая цепь представлена формулой (IIb), N_b' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или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

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

Если антисмысловая цепь представлена формулой (IIId), каждый N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Согласно одному варианту реализации N_b представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Согласно другим вариантам реализации k представляет собой 0 и 1 представляет собой 0, и антисмысловая цепь может быть представлена формулой:



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

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

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

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь агента дцРНКи может содержать мотив YYY , возникающий в 9, 10 и 11 положениях цепи, если дуплексная область представляет собой 21 нуклеотид, начиная отсчет от первого нуклеотида с 5'-конца, или необязательно начиная отсчет с первого спаренного нуклеотида в пределах дуплексной области с 5'-конца; и Y представляет собой 2'-F-модификацию. Смысловая цепь может дополнительно содержать мотив XXX или мотивы ZZZ в качестве модификаций «крыла»

на противоположном конце дуплексной области; и каждый XXX и ZZZ независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь может содержать мотив Y'Y'Y', возникающий в положениях 11, 12, 13 цепи, начиная отсчет от первого нуклеотида с 5'-конца, или необязательно начиная отсчет от первого спаренного нуклеотида в пределах дуплексной области с 5'-конца; и Y' представляет собой 2'-О-метильную модификацию. Антисмысловая цепь может дополнительно содержать мотив X'X'X' или мотивы Z'Z'Z' в качестве модификаций «крыла» на противоположном конце дуплексной области; и каждый X'X'X' и Z'Z'Z' независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

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

Соответственно, агенты дцРНКи для применения в способах согласно настоящему изобретению могут содержать смысловую цепь и антисмысловую цепь, при этом каждая цепь имеет от 14 до 30 нуклеотидов, при этом указанный дуплекс иРНК представлен формулой (III):

смысловая цепь: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

антисмысловая цепь: $3' n_{p'} - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_{q'} 5'$

(III)

где:

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

каждый p, p', q и q' независимо представляет собой 0-6;

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

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

причем каждый $n_{p'}$, n_p , $n_{q'}$ и n_q , каждый из которых может присутствовать или может не присутствовать, независимо представляет собой нуклеотид липкого конца; и

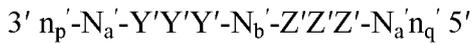
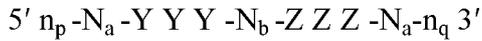
каждый XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах.

Согласно одному варианту реализации i представляет собой 0 и j представляет собой 0; или i представляет собой 1 и j представляет собой 0; или i представляет собой 0 и j представляет собой 1; или как i, так и j представляют собой 0; или как i, так и j представляют собой 1. Согласно другому варианту реализации k представляет собой 0 и l представляет собой 0; или k представляет собой 1 и l представляет собой 0; k представляет собой 0 и l представляет собой 1; или как k, так и l представляют собой 0; или как k, так и l представляют собой 1.

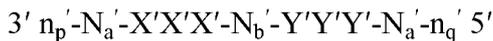
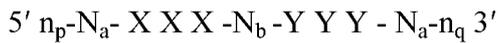
Примерные комбинации смысловой цепи и антисмысловой цепи, образующих дуплекс иРНК, включают формулы ниже:



(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



(IIIд)

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

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

Если агент дцРНКи представлен формулой (IIIc), каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Если агент дцРНКи представлен формулой (IIIд), каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a , N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a , N_a' , N_b и N_b' независимо содержит модификации в чередующемся порядке.

Каждый из X, Y и Z в формулах (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIIд) может быть одинаковым или отличающимся друг от друга.

Если агент дцРНКи представлен формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIIд), по меньшей мере один из нуклеотидов Y может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Y'. В качестве альтернативы, по меньшей мере два из нуклеотидов Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'; или все три из нуклеотидов Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'.

Если агент дцРНКи представлен формулой (IIIb) или (IIIд), по меньшей мере один из нуклеотидов Z может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Z' . В качестве альтернативы, по меньшей мере два из нуклеотидов Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z' ; или все три из нуклеотидов Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z' .

Если агент дцРНКи представлен в виде формулы (IIIс) или (IIIд), по меньшей мере один из нуклеотидов X может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов X' . В качестве альтернативы, по меньшей мере два из нуклеотидов X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X' ; или все три из нуклеотидов X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X' .

Согласно определенным вариантам реализации модификация на нуклеотиде Y отличается от модификации на нуклеотиде Y' , модификация на нуклеотиде Z отличается от модификации на нуклеотиде Z' или модификация на нуклеотиде X отличается от модификации на нуклеотиде X' .

Согласно определенным вариантам реализации, если агент дцРНКи представлен формулой (IIIд), модификации N_a представляют собой модификации 2'-О-метил или 2'-фтор. Согласно другим вариантам реализации, если агент РНКи представлен формулой (IIIд), модификации N_a представляют собой модификации 2'-О-метил или 2'-фтор, и $n_{p'} > 0$ и по меньшей мере один $n_{p'}$ связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи. Согласно другим вариантам реализации, если агент РНКи представлен формулой (IIIд), модификации N_a представляют собой модификации 2'-О-метил или 2'-фтор, $n_{p'} > 0$ и по меньшей мере один $n_{p'}$ связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, и смысловая цепь конъюгирована с одним или более производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера (описанного ниже). Согласно другим вариантам реализации, если агент РНКи представлен формулой (IIIд), модификации N_a представляют собой модификации 2'-О-метил или 2'-фтор, $n_{p'} > 0$ и по меньшей мере один $n_{p'}$ связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одним или более производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

Согласно некоторым вариантам реализации, если агент дцРНКи представлен формулой (IIIа), модификации N_a представляют собой модификации 2'-О-метил или 2'-фтор, $n_{p'} > 0$ и по меньшей мере один $n_{p'}$ связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одним или более производными GalNAc, присоединенным посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

Согласно некоторым вариантам реализации агент дцРНКи представляет собой мультимер, содержащий по меньшей мере два дуплекса, представленных формулой (III),

(Ша), (Шб), (Шс) и (Шд), причем указанные дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген или на два разных гена; или каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

Согласно некоторым вариантам реализации агент дцРНКи представляет собой мультимер, содержащий три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулой (Ш), (Ша), (Шб), (Шс) и (Шд), причем указанные дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген или на два разных гена; или каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

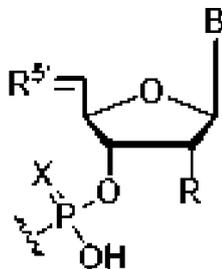
Согласно одному варианту реализации два агента дцРНКи, представленные по меньшей мере одной из формул (Ш), (Ша), (Шб), (Шс) и (Шд), связаны друг с другом на 5'-конце и одним или обоим из 3'-концов и необязательно конъюгированы с лигандом. Каждый из агентов может нацеливаться на один и тот же ген или на два разных гена; или каждый из агентов может нацеливаться на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

Согласно определенным вариантам реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению может содержать небольшое число нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификацию, например, 10 или меньше нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией. Например, агент РНКи может содержать 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией. Согласно конкретному варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению содержит 10 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией, например, 4 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в смысловой цепи и 6 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией в антисмысловой цепи. Согласно другому конкретному варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению содержит 6 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией, например, 4 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в смысловой цепи и 2 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в антисмысловой цепи.

Согласно другим вариантам реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению может содержать крайне небольшое число нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификацию, например, 2 или меньше нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификацию. Например, агент РНКи может содержать 2, 1 из 0 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией. Согласно конкретному варианту реализации агент РНКи может содержать 2 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией, например, 0 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией в смысловой цепи и 2 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в антисмысловой цепи.

В различных публикациях описаны мультимерные иРНК, которые можно применять в способах согласно настоящему изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, патент США № 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 и WO2011/031520, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно определенным вариантам реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению включают винилфосфонатную (VP) модификацию агента РНКи, описанного в настоящем документе. Согласно примерным вариантам реализации модифицированный 5'-винилфосфонатом нуклеотид согласно настоящему изобретению имеет структуру:



где X представляет собой O или S;

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

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

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

Винилфосфонат согласно настоящему изобретению может быть присоединен либо к антисмысловой, либо к смысловой цепи дцРНК согласно настоящему изобретению. Согласно определенным вариантам реализации винилфосфонат согласно настоящему изобретению присоединен к антисмысловой цепи дцРНК, необязательно на 5'-конце антисмысловой цепи дцРНК.

Модификации винилфосфатом также предусмотрены для композиций и способов согласно настоящему изобретению. Примерная структура винилфосфата включает предшествующую структуру, где R^{5'} представляет собой =C(H)-OP(O)(OH)₂, и двойная связь между C5'-углеродом и R^{5'} находится в ориентации *E* или *Z* (например, ориентации *E*).

Как более подробно описано ниже, иРНК, которая содержит конъюгаты одного или более углеводных фрагментов с иРНК, может оптимизировать одно или более свойств иРНК. Во многих случаях углеводный фрагмент будет присоединен к модифицированной субъединице иРНК. Например, рибозный сахар одной или более рибонуклеотидных субъединиц иРНК может быть заменен другим фрагментом, например, неуглеводным (например, циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидная субъединица, в которой рибозный сахар субъединицы был заменен таким образом, называется в настоящем документе модифицированной субъединицей с заменой рибозы (RRMS). Циклический носитель может представлять собой карбоциклическую кольцевую систему, т. е. все атомы кольца представляют собой атомы углерода, или гетероциклическую кольцевую систему, т. е. один или более атомов кольца

могут представлять собой гетероатом, например, азот, кислород, серу. Циклический носитель может представлять собой моноциклическую кольцевую систему или может содержать два или более колец, например, конденсированные кольца. Циклический носитель может представлять собой полностью насыщенную кольцевую систему, или он может содержать одну или более двойных связей.

Лиганд может быть присоединен к полинуклеотиду посредством носителя. Носители включают (i) по меньшей мере одну «точку присоединения к остову», например, две «точки присоединения к остову» и (ii) по меньшей мере одну «связывающую точку присоединения». «Точка присоединения к остову» в контексте настоящего документа относится к функциональной группе рибонуклеиновой кислоты, например, гидроксильной группе, или обычно к связи, доступной и подходящей для включения носителя в остов, например, фосфатный или модифицированный фосфатный, например, содержащий серу, остов. «Связывающая точка присоединения» (TAP) в некоторых вариантах реализации относится к составному атому кольца циклического носителя, например, атому углерода или гетероатому (отличному от атома, который обеспечивает точку присоединения к остову), который соединяет выбранный фрагмент. Фрагмент может представлять собой, например, углевод, например, моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид. Необязательно выбранный фрагмент соединен посредством промежуточной связки с циклическим носителем. Таким образом, циклический носитель часто будет включать функциональную группу, например, аминогруппу, или обычно обеспечивает связь, которая подходит для включения или связывания другого химического соединения, например, лиганда с составным кольцом.

иРНК может быть конъюгирована с лигандом посредством носителя, причем указанный носитель может представлять собой циклическую группу или ациклическую группу. Согласно одному варианту реализации циклическая группа выбрана из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина. Согласно одному варианту реализации ациклическая группа представляет собой сериновый остов или диэтаноламиновый остов.

i. Термически дестабилизирующие модификации

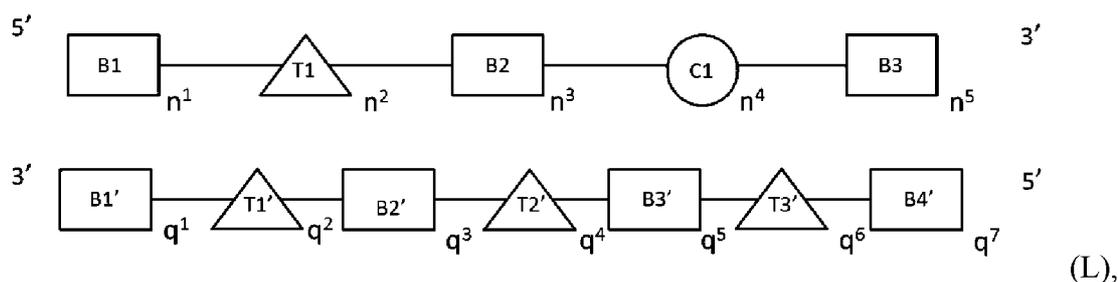
Согласно определенным вариантам реализации молекулу дцРНК можно оптимизировать для РНК-интерференции путем включения термически дестабилизирующих модификаций в затравочной области антисмысловой цепи. В настоящем документе «затравочная область» означает в положениях 2-9 5'-конца упомянутой цепи. Например, в затравочную область антисмысловой цепи можно включать термически дестабилизирующие модификации для снижения или ингибирования сайленсинга нецелевого гена.

Термин «термически дестабилизирующая модификация(ии)» включает модификацию(ии), которая приведет к получению дцРНК с более низкой общей

температурой плавления (T_m), чем T_m дцРНК без такой модификации(ий). Например, термически дестабилизирующая модификация(ии) может(могут) снижать T_m дцРНК на 1-4°C, например, на один, два, три или четыре градуса Цельсия. Также термин «термически дестабилизирующий нуклеотид» относится к нуклеотиду, содержащему одну или более термически дестабилизирующих модификаций.

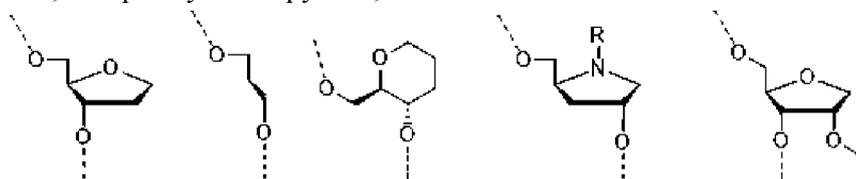
Было обнаружено, что дцРНК с антисмысловой цепью, содержащей по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, отсчитывая от 5'-конца, антисмысловой цепи, обладают сниженной активностью сайленсинга нецелевого гена. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять или более) термически дестабилизирующую модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений 5'-области антисмысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации одна или более термически дестабилизирующих модификаций дуплекса расположены в положениях 2-9, например, в положениях 4-8, с 5'-конца антисмысловой цепи. Согласно некоторым дополнительным вариантам реализации термически дестабилизирующая(ие) модификация(ии) дуплекса расположена(ы) в положении 6, 7 или 8 с 5'-конца антисмысловой цепи. Согласно некоторым дополнительным вариантам реализации термически дестабилизирующая модификация дуплекса расположена в положении 7 с 5'-конца антисмысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации термически дестабилизирующая модификация дуплекса расположена в положении 2, 3, 4, 5 или 9 с 5'-конца антисмысловой цепи.

Агент иРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, при этом каждая цепь содержит от 14 до 40 нуклеотидов. Агент РНКи может быть представлен формулой (L):



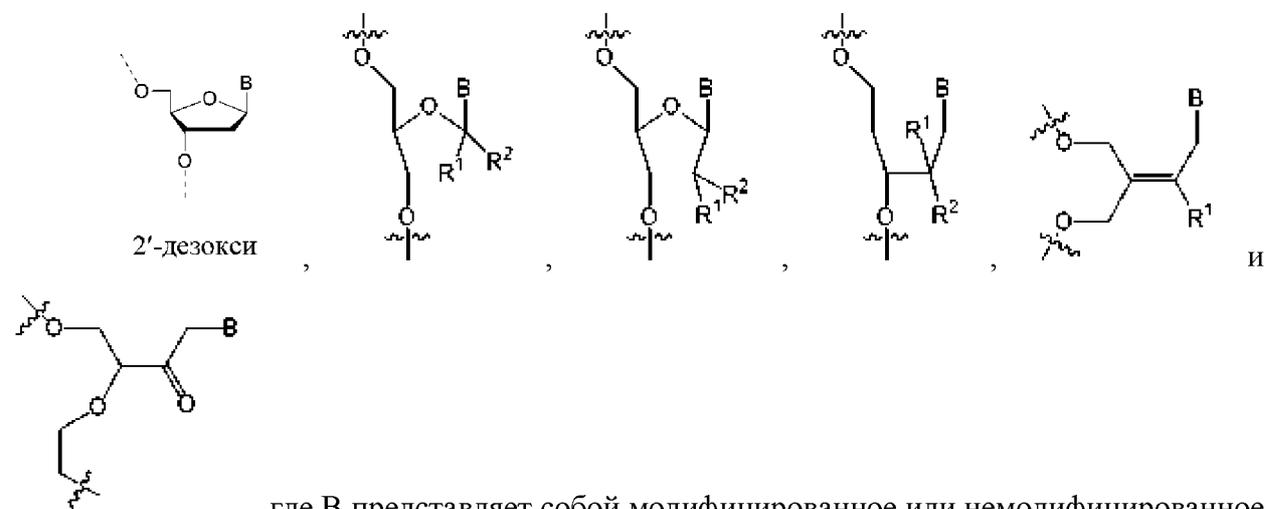
В формуле (L) каждый B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' независимо представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-алкила, 2'-замещенного алкокси, 2'-замещенного алкила, 2'-галогена, ENA и BNA/LNA. Согласно одному варианту реализации каждый B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' содержит 2'-OMe-модификации. Согласно одному варианту реализации каждый B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' содержит 2'-OMe- или 2'-F-модификации. Согласно одному варианту реализации по меньшей мере один из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' содержит 2'-O-N-метилацетамидную модификацию (2'-O-NMA, 2'O-CH₂C(O)N(Me)H).

C1 представляет собой термически дестабилизирующий нуклеотид, размещенный в сайте, противоположном затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положениях 2-8 5'-конца антисмысловой цепи). Например, C1 находится в положении смысловой цепи, которое спаривается с нуклеотидом в положениях 2-8 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере C1 находится в положении 15 от 5'-конца смысловой цепи. Нуклеотид C1 несет термически дестабилизирующую модификацию, которая может включать модификацию путем удаления азотистого основания; несовпадение с противоположным нуклеотидом в дуплексе; и модификацию сахара, такую как 2'-дезоксимо-модификация или ациклический нуклеотид, например, неблокированные нуклеиновые кислоты (UNA) или глицериновая нуклеиновая кислота (GNA), или 2'-5'-связанные рибонуклеотиды («3'-РНК»). Согласно одному варианту реализации C1 имеет термически дестабилизирующую модификацию, выбранную из группы, состоящей из: i) несовпадения с противоположным нуклеотидом в антисмысловой цепи; ii) модификацию путем удаления азотистого основания, выбранную из группы, состоящей из:



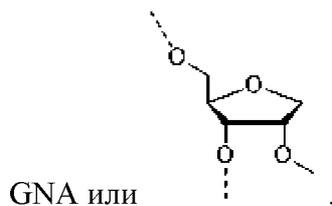
; и iii) модификацию

сахара, выбранную из группы, состоящей из:



, где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, R^1 и R^2 независимо представляют собой H, галоген, OR_3 или алкил; и R_3 представляет собой H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар. Согласно одному варианту реализации термически дестабилизирующая модификация в C1 представляет собой несовпадение, выбранное из группы, состоящей из G:G, G:A, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U, C:T, U:U, T:T и U:T; и необязательно по меньшей мере одно нуклеиновое основание в несовпадающей паре представляет собой 2'-дезоксинуклеотид. В

одном примере термически дестабилизирующая модификация в C1 представляет собой



Каждый T1, T1', T2' и T3' независимо представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию, обеспечивающую нуклеотиду стерический объем, который меньше или равен стерическому объему 2'-ОМе-модификации. Стерический объем относится к сумме стерических эффектов модификации. Способы определения стерических эффектов модификации нуклеотида известны специалисту в данной области техники. Модификация может быть в 2'-положении рибозного сахара нуклеотида или может представлять собой модификацию нерибозного нуклеотида, ациклического нуклеотида или остова нуклеотида, которая подобна или эквивалентна 2'-положению рибозного сахара, и придает нуклеотиду стерический объем, который меньше или равен стерическому объему 2'-ОМе-модификации. Например, каждый T1, T1', T2' и T3' независимо выбран из ДНК, РНК, LNA, 2'-F и 2'-F-5'-метила. Согласно одному варианту реализации T1 представляет собой ДНК. Согласно одному варианту реализации T1' представляет собой ДНК, РНК или LNA. Согласно одному варианту реализации T2' представляет собой ДНК или РНК. Согласно одному варианту реализации T3' представляет собой ДНК или РНК.

n^1 , n^3 и q^1 независимо представляют собой от 4 до 15 нуклеотидов в длину.

n^5 , q^3 и q^7 независимо представляют собой 1-6 нуклеотидов в длину.

n^4 , q^2 и q^6 независимо представляют собой 1-3 нуклеотида в длину; в качестве альтернативы, n^4 представляет собой 0.

q^5 независимо представляет собой 0-10 нуклеотидов в длину.

n^2 и q^4 независимо представляют собой 0-3 нуклеотида в длину.

В качестве альтернативы, n^4 представляет собой 0-3 нуклеотида в длину.

Согласно одному варианту реализации n^4 может представлять собой 0. В одном примере n^4 представляет собой 0, и q^2 и q^6 представляют собой 1. В другом примере n^4 представляет собой 0, и q^2 и q^6 представляют собой 1 с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи).

Согласно одному варианту реализации каждый из n^4 , q^2 и q^6 представляет собой 1.

Согласно одному варианту реализации каждый из n^2 , n^4 , q^2 , q^4 и q^6 представляет собой 1.

Согласно одному варианту реализации C1 находится в положении 14-17 5'-конца смысловой цепи, если смысловая цепь представляет собой 19-22 нуклеотида в длину, и n^4

представляет собой 1. Согласно одному варианту реализации C1 находится в положении 15 5'-конца смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации T3' начинается в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^6 равняется 1.

Согласно одному варианту реализации T1' начинается в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^2 равняется 1.

Согласно примерному варианту реализации T3' начинается от положения 2 от 5'-конца антисмысловой цепи, и T1' начинается от положения 14 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T3' начинается от положения 2 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^6 равняется 1, и T1' начинается от положения 14 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^2 равняется 1.

Согласно одному варианту реализации T1' и T3' разделены 11 нуклеотидами в длину (т. е. не учитывая нуклеотиды T1' и T3').

Согласно одному варианту реализации T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^2 равняется 1, и модификация находится в положении 2' или положениях в нерибозной группе, ациклической группе или остове, которые обеспечивают меньший стерический объем, чем 2'-ОМе-рибоза.

Согласно одному варианту реализации T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^6 равняется 1, и модификация находится в положении 2' или положениях в нерибозной группе, ациклической группе или остове, которые обеспечивают стерический объем, который меньше или равен таковому 2'-ОМе-рибозы.

Согласно одному варианту реализации T1 находится в сайте расщепления смысловой цепи. В одном примере T1 находится в положении 11 от 5'-конца смысловой цепи, если смысловая цепь представляет собой 19-22 нуклеотида в длину, и n^2 равняется 1. Согласно примерному варианту реализации T1 находится в сайте расщепления смысловой цепи в положении 11 от 5'-конца смысловой цепи, если смысловая цепь представляет собой 19-22 нуклеотида в длину, и n^2 представляет собой 1.

Согласно одному варианту реализации T2' начинается в положении 6 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T2' находится в положениях 6-10 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^4 представляет собой 1.

Согласно примерному варианту реализации T1 находится в сайте расщепления смысловой цепи, например, в положении 11 от 5'-конца смысловой цепи, если смысловая цепь представляет собой 19-22 нуклеотида в длину, и n^2 представляет собой 1; T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^2 равняется 1, и модификация T1' находится в положении 2' рибозного сахара или в положениях в нерибозной группе, ациклической группе или остове, которые обеспечивают меньший

стерический объем, чем 2'-ОМе-рибоза; T2' находится в положениях 6-10 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q⁴ представляет собой 1; и T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q⁶ равняется 1, и модификация T3' находится в положении 2' или в положениях в нерибозной группе, ациклической группе или остове, которые обеспечивают стерический объем меньший или равный таковому 2'-ОМе-рибозы.

Согласно одному варианту реализации T2' начинается в положении 8 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T2' начинается в положении 8 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q⁴ представляет собой 2.

Согласно одному варианту реализации T2' начинается в положении 9 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T2' находится в положении 9 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q⁴ представляет собой 1.

Согласно одному варианту реализации B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, T2' представляет собой 2'-F, q⁴ представляет собой 1, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 6, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи).

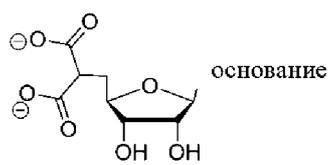
Согласно одному варианту реализации n⁴ представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, T2' представляет собой 2'-F, q⁴ представляет собой 1, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 6, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи).

Согласно одному варианту реализации B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, T2' представляет собой 2'-F, q⁴ представляет собой 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 5, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q⁷ представляет собой 1.

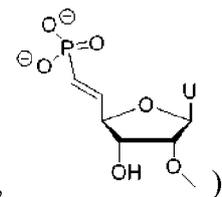
Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, q⁴ представляет собой 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 7, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, В4' представляет собой 2'-F и q⁷ представляет собой 1.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, q⁴ представляет собой 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 7, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, В4' представляет собой 2'-F, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи).

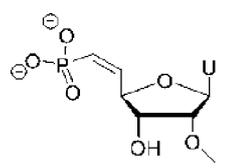
Агент РНКи может содержать фосфоросодержащую группу на 5'-конце смысловой цепи или антисмысловой цепи. 5'-концевая фосфоросодержащая группа может представлять собой 5'-концевой фосфат (5'-P), 5'-концевой фосфотиоат (5'-PS), 5'-концевой фосфодитиоат (5'-PS₂), 5'-концевой винилфосфонат (5'-VP), 5'-концевой метилфосфонат



(MePhos) или 5'-дезоксид-5'-С-малонил (). Если 5'-концевая фосфоросодержащая группа представляет собой 5'-концевой винилфосфонат (5'-VP), 5'-VP



может представлять собой либо изомер 5'-E-VP (т. е. *транс*-винилфосфат,



либо изомер 5'-Z-VP (т. е. *цис*-винилфосфат,) или их смеси.

ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, T2' представляет собой 2'-F, q⁴ представляет собой 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 5, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q⁷ представляет собой 1. Агент РНКи также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, T2' представляет собой 2'-F, q⁴ представляет собой 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 5, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q⁷ представляет собой 1. Агент РНКи также содержит 5'-PS₂.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, T2' представляет собой 2'-F, q⁴ представляет собой 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 5, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q⁷ представляет собой 1. Агент РНКи также содержит 5'-дезоксидезокси-5'-C-малонил.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, T2' представляет собой 2'-F, q⁴ представляет собой 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 5, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-P.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет

собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, T2' представляет собой 2'-F, q⁴ представляет собой 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 5, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, q⁴ представляет собой 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 7, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q⁷ представляет собой 1. Агент РНКи также содержит 5'-P.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, q⁴ представляет собой 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 7, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q⁷ представляет собой 1. Агент на основе дцРНК, также содержит 5'-PS.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, q⁴ представляет собой 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 7, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q⁷ представляет собой 1. Агент РНКи также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-

ОМе, n^5 представляет собой 3, $B1'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 представляет собой 9, $T1'$ представляет собой 2'-F, q^2 представляет собой 1, $B2'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 представляет собой 4, q^4 представляет собой 0, $B3'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 представляет собой 7, $T3'$ представляет собой 2'-F, q^6 представляет собой 1, $B4'$ представляет собой 2'-ОМе и q^7 представляет собой 1. Агент РНКи также содержит 5'-PS₂.

Согласно одному варианту реализации $B1$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 представляет собой 8, $T1$ представляет собой 2'-F, n^2 представляет собой 3, $B2$ представляет собой 2'-ОМе, n^3 представляет собой 7, n^4 представляет собой 0, $B3$ представляет собой 2'-ОМе, n^5 представляет собой 3, $B1'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 представляет собой 9, $T1'$ представляет собой 2'-F, q^2 представляет собой 1, $B2'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 представляет собой 4, q^4 представляет собой 0, $B3'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 представляет собой 7, $T3'$ представляет собой 2'-F, q^6 представляет собой 1, $B4'$ представляет собой 2'-ОМе и q^7 представляет собой 1. Агент РНКи также содержит 5'-дезоксигуанозил-5'-C-малонил.

Согласно одному варианту реализации $B1$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 представляет собой 8, $T1$ представляет собой 2'-F, n^2 представляет собой 3, $B2$ представляет собой 2'-ОМе, n^3 представляет собой 7, n^4 представляет собой 0, $B3$ представляет собой 2'-ОМе, n^5 представляет собой 3, $B1'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 представляет собой 9, $T1'$ представляет собой 2'-F, q^2 представляет собой 1, $B2'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 представляет собой 4, q^4 представляет собой 0, $B3'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 представляет собой 7, $T3'$ представляет собой 2'-F, q^6 представляет собой 1, $B4'$ представляет собой 2'-ОМе, и q^7 представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца). Агент РНКи также содержит 5'-P.

Согласно одному варианту реализации $B1$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 представляет собой 8, $T1$ представляет собой 2'-F, n^2 представляет собой 3, $B2$ представляет собой 2'-ОМе, n^3 представляет собой 7, n^4 представляет собой 0, $B3$ представляет собой 2'-ОМе, n^5 представляет собой 3, $B1'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 представляет собой 9, $T1'$ представляет собой 2'-F, q^2 представляет собой 1, $B2'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 представляет собой 4, q^4 представляет собой 0, $B3'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 представляет собой 7, $T3'$ представляет собой 2'-F, q^6 представляет собой 1, $B4'$ представляет собой 2'-ОМе, и q^7 представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных

ОМе или 2'-F, q^3 представляет собой 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 представляет собой 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 представляет собой 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

Согласно одному варианту реализации B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 представляет собой 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 представляет собой 7, n^4 представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 представляет собой 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 представляет собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 представляет собой 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 представляет собой 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 представляет собой 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 представляет собой 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-PS₂.

Согласно одному варианту реализации B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 представляет собой 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 представляет собой 7, n^4 представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 представляет собой 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 представляет собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 представляет собой 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 представляет собой 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 представляет собой 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 представляет собой 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-дезоксидезокси-5'-C-малонил.

Согласно одному варианту реализации B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 представляет собой 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 представляет собой 7, n^4 представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 представляет собой 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 представляет

нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту реализации 5'-P находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, T2' представляет собой 2'-F, q⁴ представляет собой 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 5, ТЗ' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту реализации 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, T2' представляет собой 2'-F, q⁴ представляет собой 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 5, ТЗ' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд.

Согласно одному варианту реализации 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, T2' представляет собой 2'-F, q⁴ представляет собой 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 5, ТЗ' представляет собой

2'-F, q⁶ представляет собой 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-PS₂ и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту реализации 5'-PS₂ находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, Т2' представляет собой 2'-F, q⁴ представляет собой 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 5, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту реализации 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, q⁴ представляет собой 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 7, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца). Агент РНКи также содержит 5'-Р и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту реализации 5'-Р находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, q⁴ представляет собой 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 7, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца). Агент РНКи также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту реализации 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, q⁴ представляет собой 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 7, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца). Агент РНКи также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту реализации 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, q⁴ представляет собой 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 7, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных

связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца). Агент РНКи также содержит 5'-PS₂ и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту реализации 5'-PS₂ находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, q⁴ представляет собой 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 7, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца). Агент РНКи также содержит 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту реализации 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, Т2' представляет собой 2'-F, q⁴ представляет собой 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 5, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, В4' представляет собой 2'-F, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-Р и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту реализации 5'-Р находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, В2' представляет собой 2'-

ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, T2' представляет собой 2'-F, q⁴ представляет собой 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 5, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-F, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту реализации 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, T2' представляет собой 2'-F, q⁴ представляет собой 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 5, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-F, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту реализации 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, T1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, T1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, T2' представляет собой 2'-F, q⁴ представляет собой 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 5, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-F, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-PS₂ и

нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту реализации 5'-PS₂ находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, Т2' представляет собой 2'-F, q⁴ представляет собой 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 5, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, В4' представляет собой 2'-F, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту реализации 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, q⁴ представляет собой 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 7, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, В4' представляет собой 2'-F, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-Р и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту реализации 5'-Р находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, q⁴ представляет собой 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 7, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой

1, В4' представляет собой 2'-F, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту реализации 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, q⁴ представляет собой 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 7, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, В4' представляет собой 2'-F, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту реализации 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, q⁴ представляет собой 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 7, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, В4' представляет собой 2'-F, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-PS₂ и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту реализации 5'-PS₂ находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ представляет собой 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² представляет собой 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ представляет собой 7, n⁴ представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ представляет собой 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ представляет собой 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² представляет собой 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ представляет собой 4, q⁴ представляет собой 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ представляет собой 7, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, В4' представляет собой 2'-F, и q⁷ представляет собой 1; с двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя фосфотиоатными модификациями межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи). Агент РНКи также содержит 5'-дезоксипентановую кислоту и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту реализации 5'-дезоксипентановая кислота находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

Согласно конкретному варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению содержит:

(а) смысловую цепь, имеющую:

(i) 21 нуклеотид в длину;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, причем указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера; и

(iii) 2'-F-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9-11, 13, 17, 19 и 21 и 2'-ОМе-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 12, 14-16, 18 и 20 (отсчитывая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) 23 нуклеотида в длину;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3, 5, 9, 11-13, 15, 17, 19, 21 и 23 и 2'-F-модификации в положениях 2, 4, 6-8, 10, 14, 16, 18, 20 и 22 (отсчитывая от 5'-конца); и

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (отсчитывая от 5'-конца);

причем указанные агенты на основе дцРНК имеют двухнуклеотидный липкий конец на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно другому варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению содержит:

(а) смысловую цепь, имеющую:

(i) 21 нуклеотид в длину;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, причем указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-F-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9-11, 13, 15, 17, 19 и 21 и 2'-ОМе-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18 и 20 (отсчитывая от 5'-конца); и

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (отсчитывая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) 23 нуклеотида в длину;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9, 11-13, 15, 17, 19 и 21-23 и 2'-F-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18 и 20 (отсчитывая от 5'-конца); и

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (отсчитывая от 5'-конца);

причем указанные агенты РНКи имеют двухнуклеотидный липкий конец на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно другому конкретному варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) 21 нуклеотид в длину;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, причем указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1-6, 8, 10 и 12-21, 2'-F-модификации в положениях 7 и 9 и дезоксинуклеотид (например, dT) в положении 11 (отсчитывая от 5'-конца); и

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (отсчитывая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) 23 нуклеотида в длину;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 и 19-23 и 2'-F-модификации в положениях 2, 4-6, 8, 10, 12, 14, 16 и 18 (отсчитывая от 5'-конца); и

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (отсчитывая от 5'-конца);

причем указанные агенты РНКи имеют двухнуклеотидный липкий конец на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно другому конкретному варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) 21 нуклеотид в длину;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, причем указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1-6, 8, 10, 12, 14, 16-21 и 2'-F-модификации в положениях 7, 9, 11, 13 и 15; и

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (отсчитывая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) 23 нуклеотида в длину;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 и 21-23 и 2'-F-модификации в положениях 2-4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20 (отсчитывая от 5'-конца); и

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (отсчитывая от 5'-конца);

причем указанные агенты РНКи имеют двухнуклеотидный липкий конец на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно другому конкретному варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) 21 нуклеотид в длину;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, причем указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1-9 и 12-21 и 2'-F-модификации в положениях 10 и 11; и

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (отсчитывая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) 23 нуклеотида в длину;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9, 11-13, 15, 17, 19 и 21-23 и 2'-F-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18 и 20 (отсчитывая от 5'-конца); и

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (отсчитывая от 5'-конца);

причем указанные агенты РНКи имеют двухнуклеотидный липкий конец на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно другому конкретному варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) 21 нуклеотид в длину;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, причем указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-F-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9-11 и 13 и 2'-ОМе-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 12 и 14-21; и

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (отсчитывая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) 23 нуклеотида в длину;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3, 5-7, 9, 11-13, 15, 17-19 и 21-23 и 2'-F-модификации в положениях 2, 4, 8, 10, 14, 16 и 20 (отсчитывая от 5'-конца); и

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (отсчитывая от 5'-конца);

причем указанные агенты РНКи имеют двухнуклеотидный липкий конец на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно другому конкретному варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) 21 нуклеотид в длину;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, причем указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 15, 17 и 19-21 и 2'-F-модификации в положениях 3, 5, 7, 9-11, 13, 16 и 18; и

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (отсчитывая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) 25 нуклеотидов в длину;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 4, 6, 7, 9, 11-13, 15, 17 и 19-23, 2'-F-модификации в положениях 2, 3, 5, 8, 10, 14, 16 и 18 и дезоксинуклеотиды (например, dT) в положениях 24 и 25 (отсчитывая от 5'-конца); и

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (отсчитывая от 5'-конца);

причем указанные агенты РНКи имеют четырехнуклеотидный липкий конец на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно другому конкретному варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) 21 нуклеотид в длину;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, причем указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1-6, 8, 12-21 и 2'-F-модификации в положениях 7 и 9-11; и

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (отсчитывая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) 23 нуклеотида в длину;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3-5, 7, 8, 10-13, 15, 17-23 и 2'-F-модификации в положениях 2, 6, 9, 14 и 16 (отсчитывая от 5'-конца); и

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (отсчитывая от 5'-конца);

причем указанные агенты РНКи имеют двухнуклеотидный липкий конец на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно другому конкретному варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) 21 нуклеотид в длину;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, причем указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1-6, 8, 12-21 и 2'-F-модификации в положениях 7 и 9-11; и

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (отсчитывая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) 23 нуклеотида в длину;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3-5, 7, 10-13, 15 и 17-23 и 2'-F-модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 (отсчитывая от 5'-конца); и

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (отсчитывая от 5'-конца);

причем указанные агенты РНКи имеют двухнуклеотидный липкий конец на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно другому конкретному варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) 19 нуклеотидов в длину;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, причем указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1-4, 6 и 10-19 и 2'-F-модификации в положениях 5 и 7-9; и

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (отсчитывая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) 21 нуклеотид в длину;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3-5, 7, 10-13, 15 и 17-21 и 2'-F-модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 (отсчитывая от 5'-конца); и

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 19 и 20 и между нуклеотидными положениями 20 и 21 (отсчитывая от 5'-конца);

причем указанные агенты РНКи имеют двухнуклеотидный липкий конец на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно определенным вариантам реализации иРНК для применения в способах согласно настоящему изобретению представляет собой агент, выбранный из агентов, перечисленных в любой из Таблиц 2-3 и 7-8. Указанные агенты могут дополнительно содержать лиганд.

III. иРНК, конъюгированные с лигандами

Другая модификация РНК в случае иРНК согласно настоящему изобретению включает химическое связывание иРНК с одним или более лигандами, фрагментами или конъюгатами, которые повышают активность, клеточное распределение или клеточное поглощение указанной иРНК, например, в клетку. Такие фрагменты включают, но не ограничиваются перечисленными, липидные фрагменты, такие как фрагмент холестерина (Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556). Согласно другим вариантам реализации лиганд представляет собой холевую кислоту (Manoharan *et al.*, *Biorg. Med.*

Chem. Let., 1994, 4:1053-1060), простой тиозфир, например, берил-S-третилтиол (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Let.*, 1993, 3:2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538), алифатическую цепь, например, додекандиоловые или ундециловые остатки (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J*, 1991, 10:1111-1118; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327-330; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49-54), фосфолипид, например, дигексадецил-рац-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-фосфонат (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777-3783), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973), или адамантануксусную кислоту (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), пальмитильный фрагмент (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237), или фрагмент октадециламина или гексиламинокарбонилхлестерина (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

Согласно определенным вариантам реализации лиганд изменяет распределение, нацеливание или время жизни агента иРНК, в который он включен. Согласно некоторым вариантам реализации лиганд обеспечивает повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, например, молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, например, клеточного или органного компартмента, ткани, органа или участка тела, по сравнению, например, с соединением, не имеющим такого лиганда. Согласно некоторым вариантам реализации лиганды не принимают участия в дуплексном спаривании в дуплексной нуклеиновой кислоте.

Лиганды могут включать встречающееся в природе вещество, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин или гиалуроновую кислоту); или липид. Лиганд также может представлять собой рекомбинантную или синтетическую молекулу, такую как синтетический полимер, например, синтетическую полиаминокислоту. Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, представляющую собой полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер поли-L-лактида и гликолида, сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламида (НМРА), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли-2-этилакриловую кислоту, полимеры N-изопропилакриламида или полифосфазин. Примерные полиамины включают: полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметический полиамин, дендримерный полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфилин, четвертичную соль полиамина или альфа-спиральный пептид.

Лиганды также могут включать нацеливающие группы, например, нацеливающий на клетки или ткани агент, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например,

антитело, которое связывается с указанным типом клеток, таким как клетка почки. Нацеливающая группа может представлять собой тиротропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, углевод муцина, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин В12, витамин А, биотин или пептид RGD или миметик пептида RGD. Согласно определенным вариантам реализации лиганд представляет собой поливалентную галактозу, например, N-ацетилгалактозамин.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие агенты (например, акридины), сшивающие линкеры (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, пирен-1-масляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилоксигексилловую группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, О3-(олеоил)литохолевую кислоту, О3-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил, или феноксазин) и пептидные конъюгаты (например, пептид antennapedia, пептид Tat), алкилирующие агенты, фосфат, аминокислота, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченные радиоактивной меткой маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), усилители транспорта/всасывания (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, кластеры имидазола, конъюгаты акридина и имидазола, комплексы Eu³⁺ тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

Лиганды могут представлять собой белки, например, гликопротеины или пептиды, например, молекулы, обладающие специфичной аффинностью в отношении ко-лиганда, или антитела, например, антитело, которое связывается с указанным типом клеток, таким как клетка печени. Лиганды также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать непептидные соединения, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу или поливалентную фукозу. Лиганд может представлять собой, например, липополисахарид, активатор киназы p38 MAP или активатор NF- κ B.

Лиганд может представлять собой вещество, например, лекарственное средство, которое может увеличивать поглощение агента иРНК в клетку, например, путем разрушения цитоскелета клетки, например, путем разрушения микротрубочек, микрофиламентов или промежуточных филаментов клетки. Лекарственное средство может

представлять собой, например, таксол, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинголид А, инданоцин или миосервин.

Согласно некоторым вариантам реализации лиганд, присоединенный к иРНК, описанной в настоящем документе, действует в качестве модулятора фармакокинетики (модулятора ФК). Модуляторы ФК включают липофильные соединения, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, связывающие белки агенты, PEG, витамины и т. д. Примерные модуляторы ФК включают, но не ограничиваются перечисленными, холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицериды, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин. Известно, что олигонуклеотиды, которые содержат ряд фосфотиоатных связей, также связываются с сывороточным белком, таким образом, короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды, состоящие из примерно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие несколько фосфотиоатных связей в остове, также приемлемы для настоящего изобретения в качестве лигандов (например, в качестве ФК-модулирующих лигандов). Кроме того, аптамеры, которые связывают сывороточные компоненты (например, сывороточные белки), также подходят для применения в качестве ФК-модулирующих лигандов в вариантах реализации, описанных в настоящем документе.

Конъюгированные с лигандами иРНК согласно настоящему изобретению можно синтезировать с использованием олигонуклеотида, который несет боковую реакционноспособную функциональную группу, например, полученную в результате присоединения связывающей молекулы на олигонуклеотид (описано ниже). Указанный реактивный олигонуклеотид может быть подвергнут непосредственной реакции с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезируются как несущие любую из множества защитных групп, или лигандами, которые имеют присоединенный к ним связывающий фрагмент.

Олигонуклеотиды, применяемые в конъюгатах согласно настоящему изобретению, могут быть получены удобным и рутинным образом с помощью хорошо известной методики твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза продается несколькими поставщиками, включая, например, Applied Biosystems® (Фостер-Сити, Калифорния). Для такого синтеза можно дополнительно или альтернативно использовать любые другие способы, известные в данной области техники. Также известно, что подобные методики применяют для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфотиоаты и алкилированные производные.

В конъюгированных с лигандом иРНК и несущих молекулу лиганда специфичных в отношении последовательности связанных нуклеозидах согласно настоящему изобретению олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем синтезаторе ДНК с использованием стандартных нуклеотидных или нуклеозидных предшественников, или нуклеотидных или нуклеозидных конъюгированных предшественников, которые уже несут связывающий фрагмент, предшественников лиганд-нуклеотид или нуклеозид-

конъюгат, которые уже несут молекулу лиганда, или нуклеозидных несущих лиганд строительных блоков.

При использовании предшественников нуклеотид-конъюгат, которые уже несут связывающий фрагмент, синтез специфичных в отношении последовательности связанных нуклеозидов, как правило, завершают, а затем проводят реакцию молекулы лиганда со связывающим фрагментом с образованием конъюгированного с лигандом олигонуклеотида. Согласно некоторым вариантам реализации олигонуклеотида или связанные нуклеозиды согласно настоящему изобретению синтезируют с помощью автоматического синтезатора с применением фосфорамидитов, полученных из конъюгатов лиганд-нуклеозид, в дополнение к стандартным фосфорамидитам и нестандартным фосфорамидитам, которые являются коммерчески доступными и обычно используются в синтезе олигонуклеотидов.

Липидные конъюгаты

Согласно определенным вариантам реализации лиганд или конъюгат представляет собой липид или основанную на липиде молекулу. Согласно одному варианту реализации такой липид или основанная на липиде молекула связывает сывороточный белок, например, сывороточный альбумин человека (HSA). Связывающий HSA лиганд обеспечивает возможность распределения конъюгата в целевую ткань, например, в отличную от почки целевую ткань организма. Например, целевая ткань может представлять собой печень, включая паренхимальные клетки печени. Другие молекулы, которые могут связываться с HSA, также можно применять в качестве лигандов. Например, можно применять напроксен или аспирин. Липид или основанный на липиде лиганд может (a) повышать устойчивость к деградации конъюгата, (b) увеличивать нацеливание или транспорт в целевую клетку или клеточную мембрану, или (c) может применяться для корректировки связывания с сывороточным белком, например, HSA.

Лиганд на основе липида можно применять для ингибирования, например, контроля связывания конъюгата с целевой тканью. Например, липид или лиганд на основе липида, который сильнее связывается с HSA, будет менее вероятно нацелен на почку и, следовательно, менее вероятно, будет выведен из организма. Липид или лиганд на основе липида, который менее сильно связывается с HSA, можно применять для нацеливания конъюгата на почку.

Согласно определенным вариантам реализации лиганд на основе липида связывает HSA. Согласно одному варианту реализации он связывается с HSA с достаточной аффинностью так, что конъюгат будет распределяться в ткань, отличную от ткани почки. Однако предпочтительно аффинность не настолько сильная, чтобы связывание HSA и лиганда невозможно было обратить вспять.

Согласно другим вариантам реализации лиганд на основе липида слабо или совсем не связывается с HSA. Согласно одному варианту реализации конъюгат будет распределяться в почку. Другие фрагменты, которые нацелены в клетки почки, также можно применять вместо лиганда на основе липида или в дополнение к нему.

В другом аспекте лиганд представляет собой фрагмент, например, витамин, который поглощается целевой клеткой, например, пролиферирующей клеткой. Они особенно применимы для лечения нарушений, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например, злокачественного или незлокачественного типа, например, раковых клеток. Примерные витамины включают витамины А, Е и К. Другие примерные витамины включают витамин В, например, фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль или другие витамины или питательные вещества, поглощаемые целевыми клетками, такими как клетки печени. Также включены HSA и липопротеин низкой плотности (LDL).

В. Агенты для проникновения в клетки

В другом аспекте лиганд представляет собой агент для проникновения в клетку, такой как спиральный агент для проникновения в клетку. Согласно одному варианту реализации агент является амфипатическим. Примерный агент представляет собой пептид, такой как tat или antennopedia. Если агент представляет собой пептид, он может быть модифицирован, включая пептидилмиметик, инвертомеры, непептидные или псевдопептидные связи и применение D-аминокислот. Согласно одному варианту реализации спиральный агент представляет собой альфа-спиральный агент, который имеет липофильную и липофобную фазу.

Лиганд может представлять собой пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в настоящем документе олигопептидомиметиком) представляет собой молекулу, способную укладываться в определенную трехмерную структуру, сходную с природным пептидом. Присоединение пептида и пептидомиметиков к агентам иРНК может влиять на фармакокинетическое распределение иРНК, например, посредством усиления распознавания и всасывания клетками. Пептид или фрагмент пептидомиметика может иметь примерно 5-50 аминокислот в длину, например, примерно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот в длину.

Пептид или пептидомиметик может представлять собой, например, пептид для проникновения в клетки, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий главным образом из Tug, Tgr или Phe). Пептидный фрагмент может представлять собой дендримерный пептид, ограниченный пептид или сшитый пептид. В другом альтернативном варианте пептидный фрагмент может включать гидрофобную последовательность мембранной транслокации (MTS). Примерный гидрофобный MTS-содержащий пептид представляет собой RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 14). Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 15), содержащий гидрофобную MTS, также может представлять собой нацеливающий фрагмент. Пептидный фрагмент может представлять собой пептид для «доставки», который может переносить большие полярные молекулы, включая пептиды, олигонуклеотиды и белок, через клеточные мембраны. Например, было обнаружено, что последовательности из белка Tat ВИЧ (GRKKRRQRRPPQ (SEQ ID NO: 16)) и белка Antennapedia дрозофил

(RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 17)) способны функционировать в качестве пептидов для доставки. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться случайной последовательностью ДНК, такой как пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея или комбинаторной библиотеки «одна гранула-одно соединение» (ОВОС) (Lam *et al.*, Nature, 354:82-84, 1991). Пример пептида или пептидомиметика, присоединенного к агенту на основе дцРНК посредством включенного мономерного звена, для нацеливания на клетку представляет собой пептид аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD) или миметик RGD. Длина пептидного фрагмента может находиться в диапазоне от примерно 5 аминокислот до примерно 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут иметь структурную модификацию, например, для повышения стабильности или направления конформационных свойств. Можно применять любую из структурных модификаций, описанных ниже.

Пептид RGD для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению может быть линейным или циклическим и может быть модифицирован, например, гликозилирован или метилирован, чтобы облегчить нацеливание на конкретную ткань(и). RGD-содержащие пептиды и пептидомиметики могут включать D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD можно применять другие фрагменты, которые нацелены на лиганд интегрина, например, PECAM-1 или VEGF.

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

С. Конъюгаты углеводов

Согласно некоторым вариантам реализации композиций и способов согласно настоящему изобретению иРНК дополнительно содержит углевод. Конъюгированная с углеводом иРНК является предпочтительной для доставки нуклеиновых кислот *in vivo*, а также композиций, подходящих для терапевтического применения *in vivo*, описанных в настоящем документе. В настоящем документе «углевод» относится к соединению, которое представляет собой либо углевод как таковой, состоящий из одного или более моносахаридных звеньев, содержащих по меньшей мере 6 атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода; либо соединение, имеющее в качестве своей части углеводный фрагмент, состоящий из одного или более моносахаридных звеньев, каждое из

которых содержит по меньшей мере шесть атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Типичные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие примерно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных звеньев) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные камеди. Конкретные моносахариды включают C5 и выше (например, C5, C6, C7 или C8) сахара; ди- и трисахариды включают сахара, содержащие два или три моносахаридных звена (например, C5, C6, C7 или C8).

Согласно определенным вариантам реализации углеводный конъюгат для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению представляет собой моносахарид.

Согласно определенным вариантам реализации моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин (GalNAc). Конъюгаты GalNAc, которые содержат одно или более производных N-ацетилгалактозамина (GalNAc), описаны, например, в US 8106022, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc служит в качестве лиганда, который нацеливает иРНК на конкретные клетки. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc нацеливает иРНК на клетки печени, например, играя роль лиганда для асиалогликопротеинового рецептора клеток печени (например, гепатоцитов).

Согласно некоторым вариантам реализации углеводный конъюгат содержит одно или более производных GalNAc. Производные GalNAc могут быть присоединены посредством линкера, например, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc конъюгирован с агентом иРНК (например, с 3'-концом смысловой цепи) посредством линкера, например, линкера, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc конъюгирован с 5'-концом смысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc конъюгирован с агентом иРНК (например, с 5'-концом смысловой цепи) посредством линкера, например, линкера, описанного в настоящем документе.

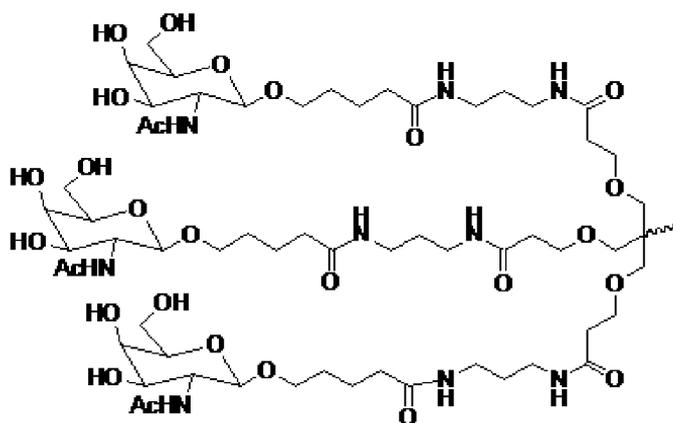
Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством одновалентного линкера. Согласно некоторым вариантам реализации GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством двухвалентного линкера. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством трехвалентного линкера. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством четырехвалентного линкера.

Согласно определенным вариантам реализации двухцепочечные агенты РНКи согласно настоящему изобретению содержат один GalNAc или производное GalNAc, присоединенное к агенту иРНК. Согласно определенным вариантам реализации двухцепочечные агенты РНКи согласно настоящему изобретению содержат множество (например, 2, 3, 4, 5 или 6) GalNAc или производных GalNAc, каждое из которых независимо присоединено к множеству нуклеотидов двухцепочечного агента РНКи посредством множества одновалентных линкеров.

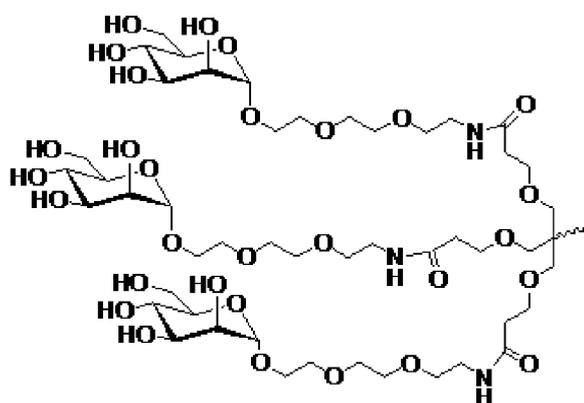
Согласно некоторым вариантам реализации, например, если две цепи агента иРНК согласно настоящему изобретению являются частью одной более крупной молекулы и соединены непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи с образованием петли шпильки, содержащей множество неспаренных нуклеотидов, каждый неспаренный нуклеотид в петле шпильки может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенное посредством одновалентного линкера. Петля шпильки также может быть образована удлиненным липким концом в одной цепи дуплекса.

Согласно некоторым вариантам реализации, например, если две цепи агента иРНК согласно настоящему изобретению являются частью одной более крупной молекулы и соединены непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи с образованием петли шпильки, содержащей множество неспаренных нуклеотидов, каждый неспаренный нуклеотид в петле шпильки может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенное посредством одновалентного линкера. Петля шпильки также может быть образована удлиненным липким концом в одной цепи дуплекса.

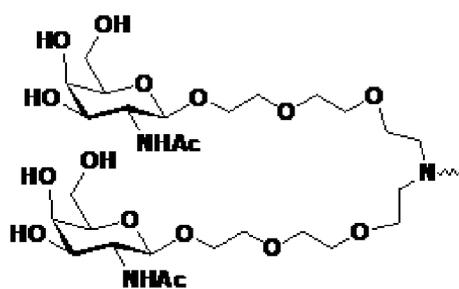
Согласно одному варианту реализации углеводный конъюгат для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из:



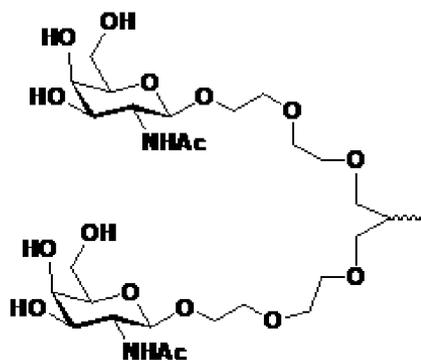
Формула II,



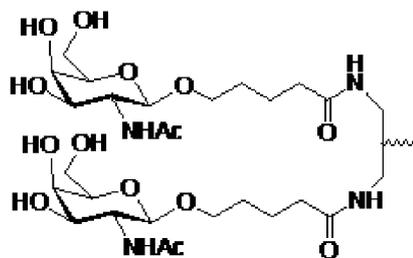
Формула III,



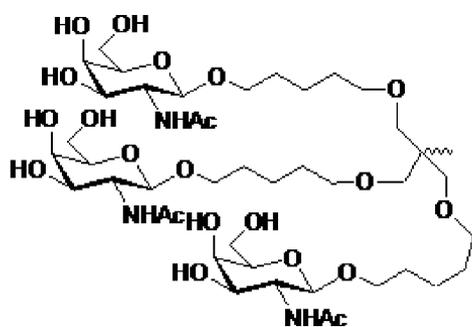
Формула IV,



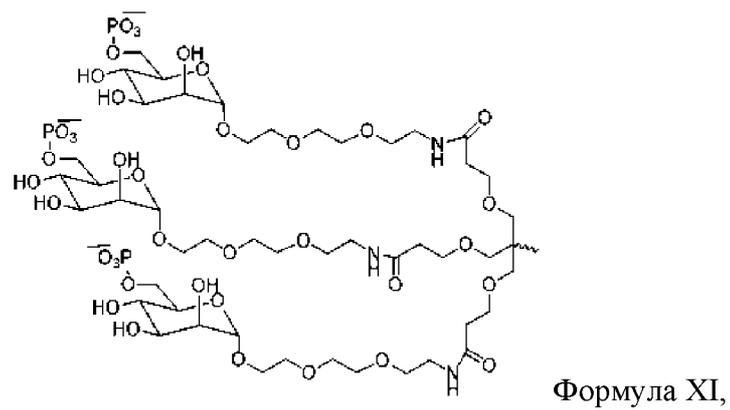
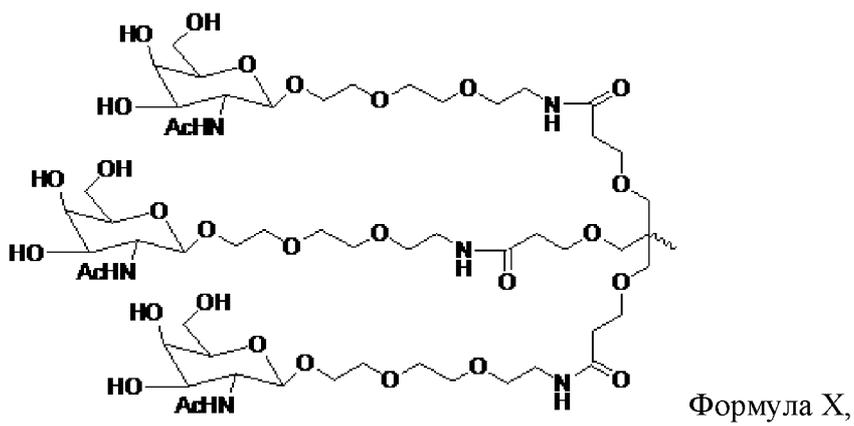
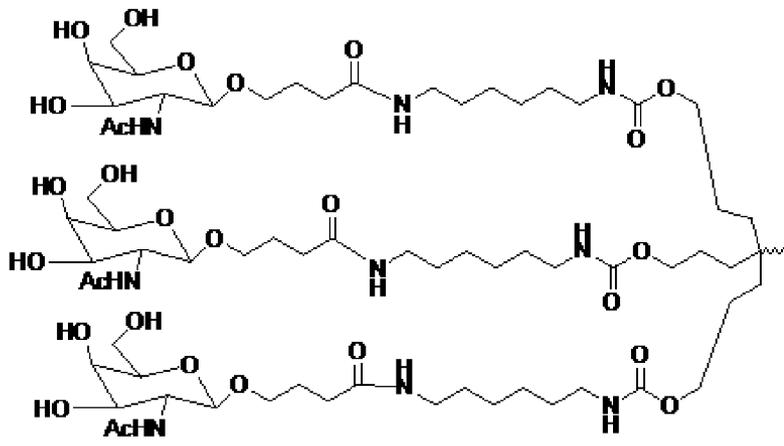
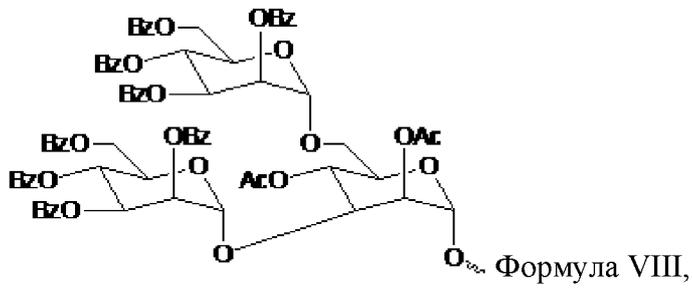
Формула V,

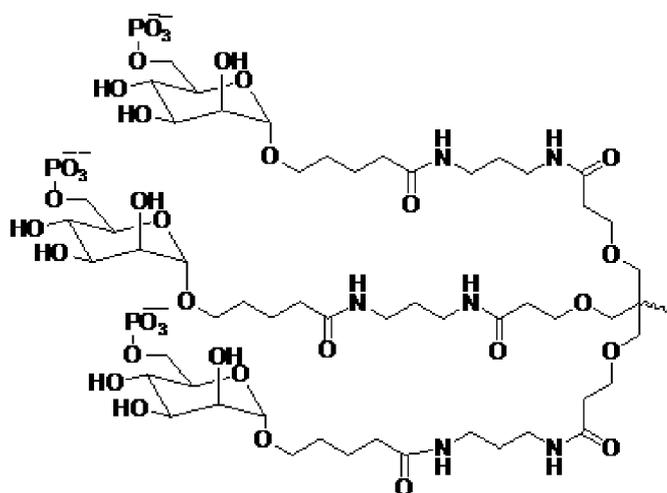


Формула VI,

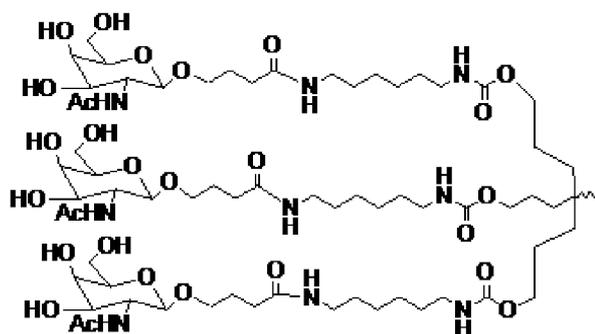


Формула VII,

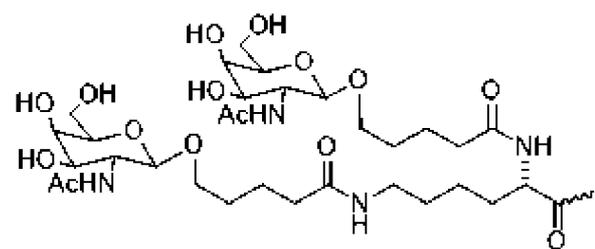




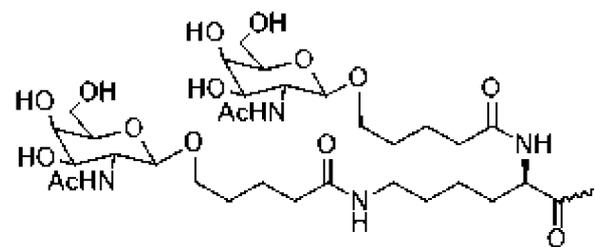
Формула XII,



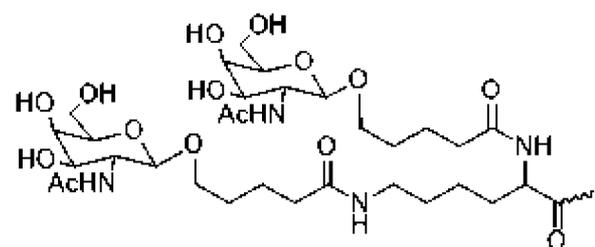
Формула XIII,



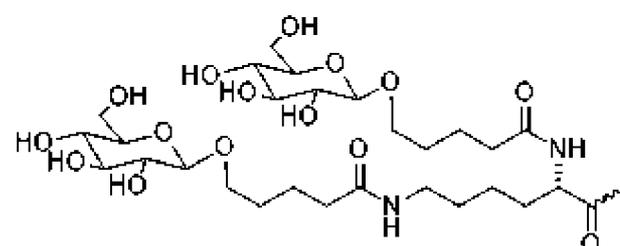
Формула XIV,



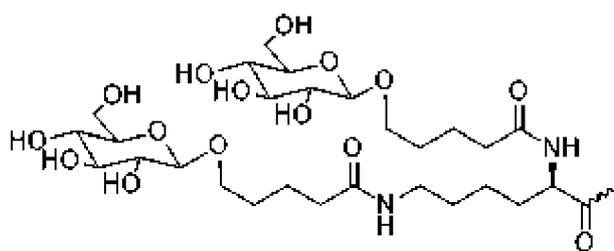
Формула XV,



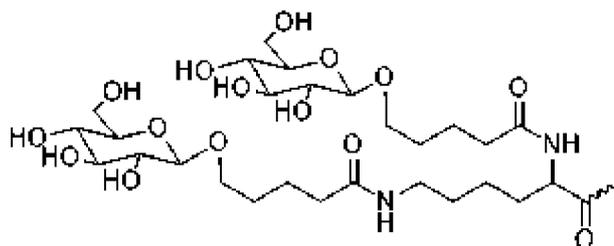
Формула XVI,



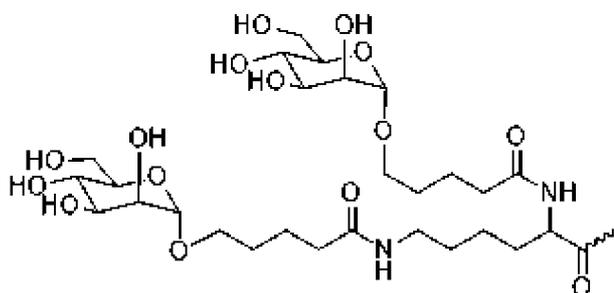
Формула XVII,



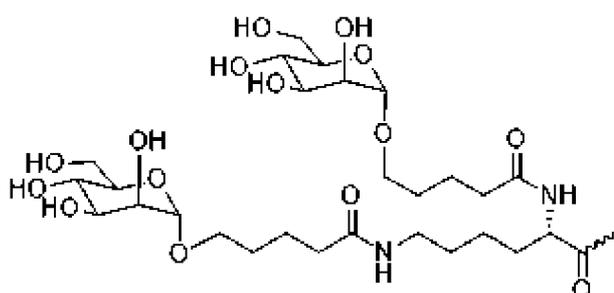
Формула XVIII,



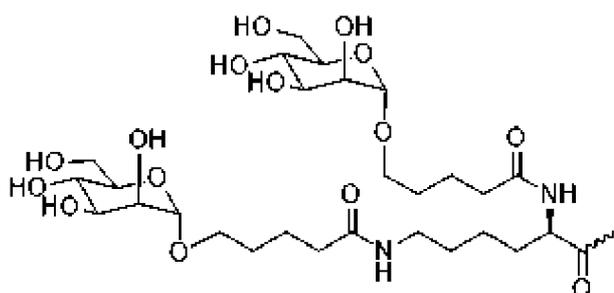
Формула XIX,



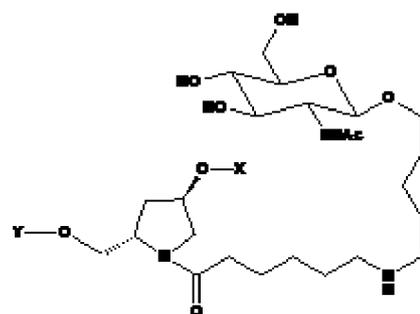
Формула XX,



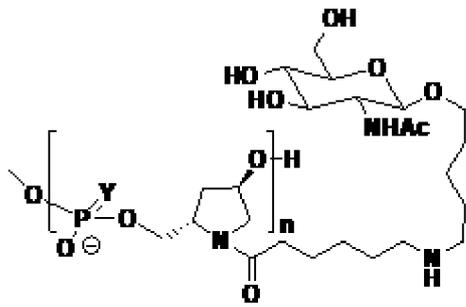
Формула XXI,



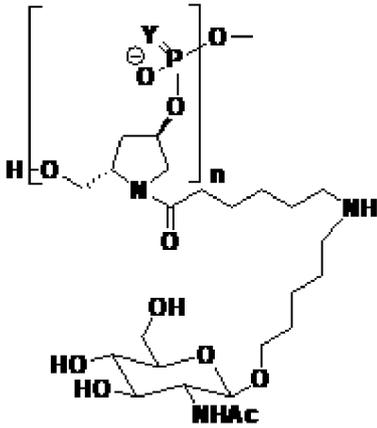
Формула XXII,



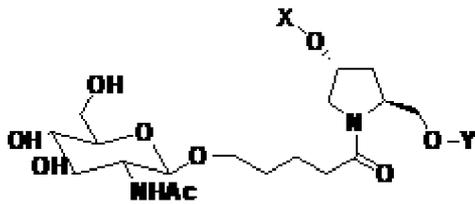
Формула XXIII;



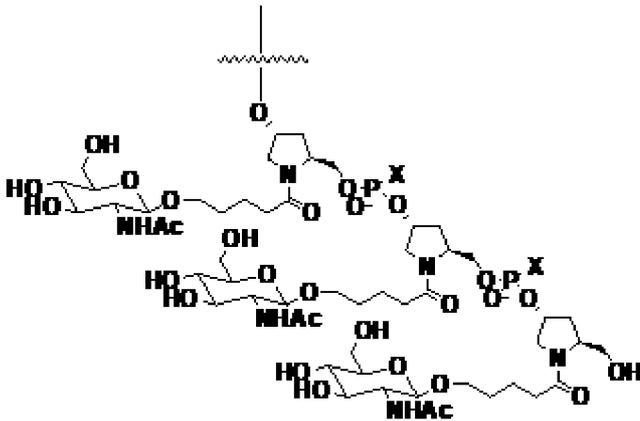
, где Y представляет собой O или S, и n представляет собой 3-6 (Формула XXIV);



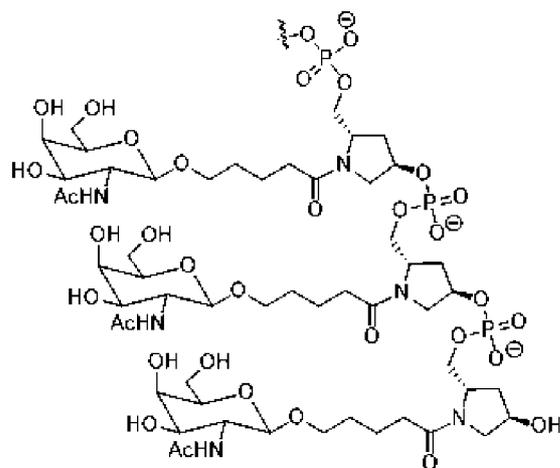
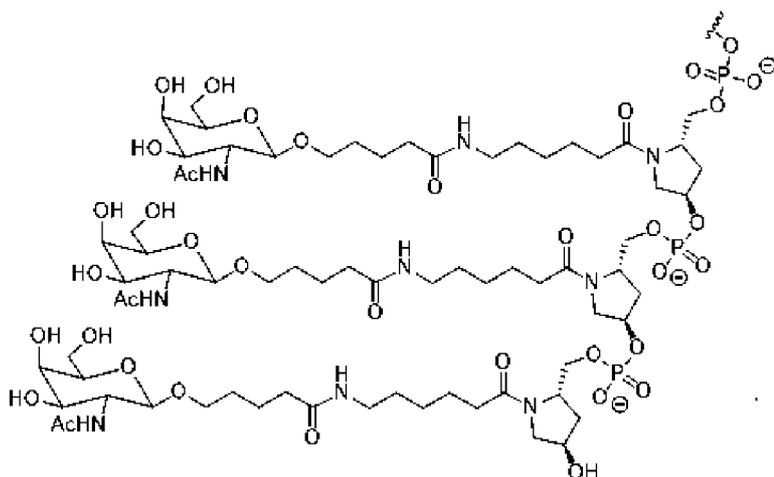
, где Y представляет собой O или S, и n представляет собой 3-6 (Формула XXV);



Формула XXVI;

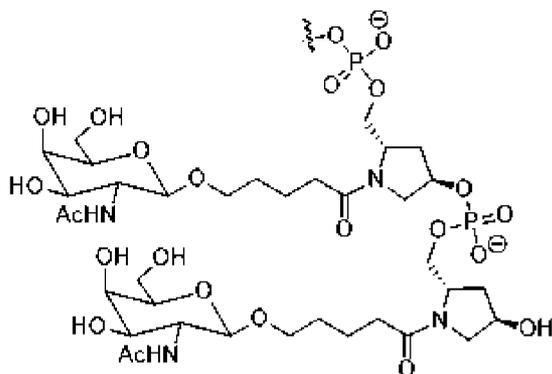
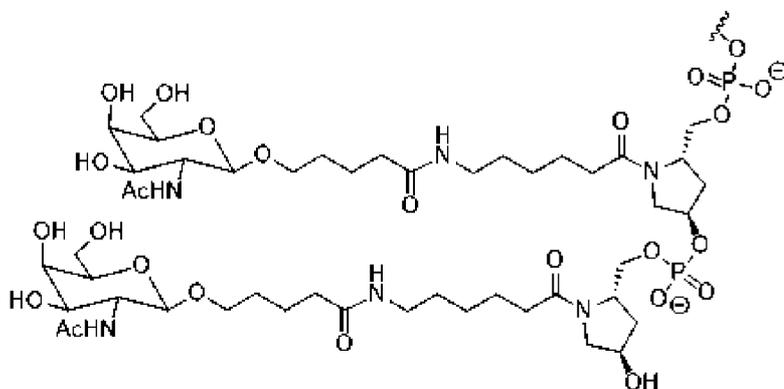


, где X представляет собой O или S (Формула XXVII);



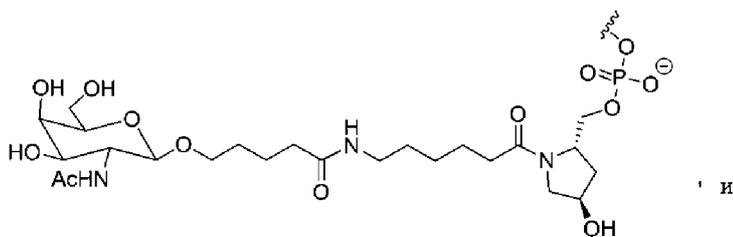
Формула XXVII; Формула

XXIX;

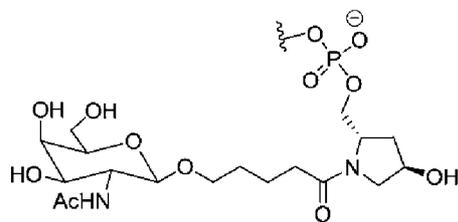


Формула XXX;

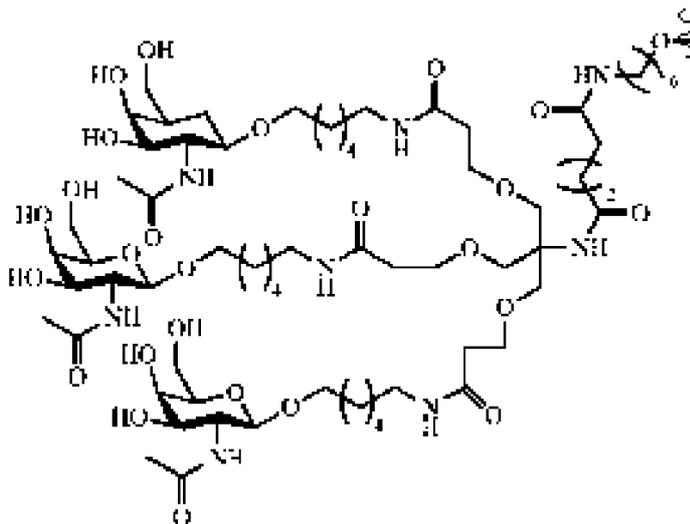
Формула XXXI;



Формула XXXII;

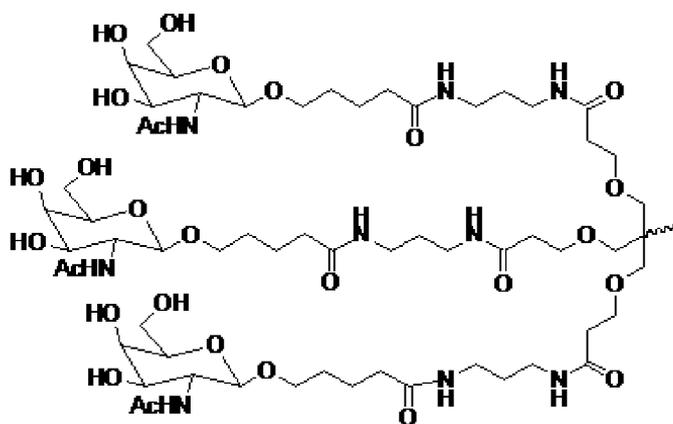


Формула XXXIII.



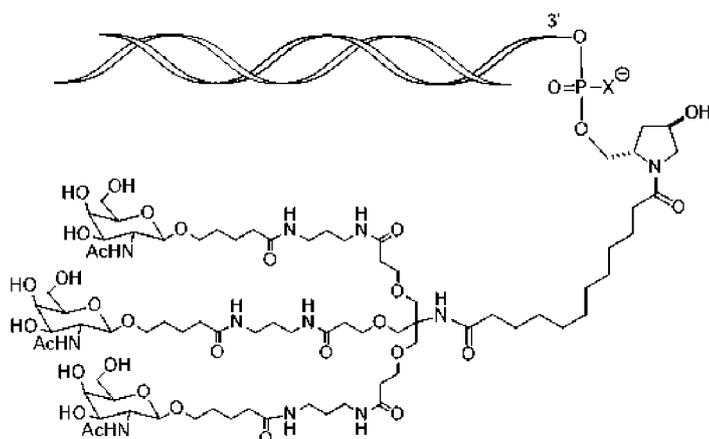
Формула XXXIV.

Согласно другому варианту реализации углеводный конъюгат для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению представляет собой моносахарид. Согласно одному варианту реализации моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин, такой как

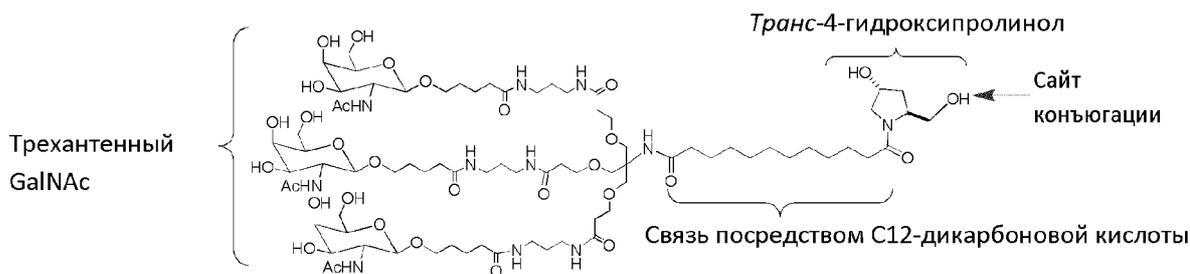


Формула II.

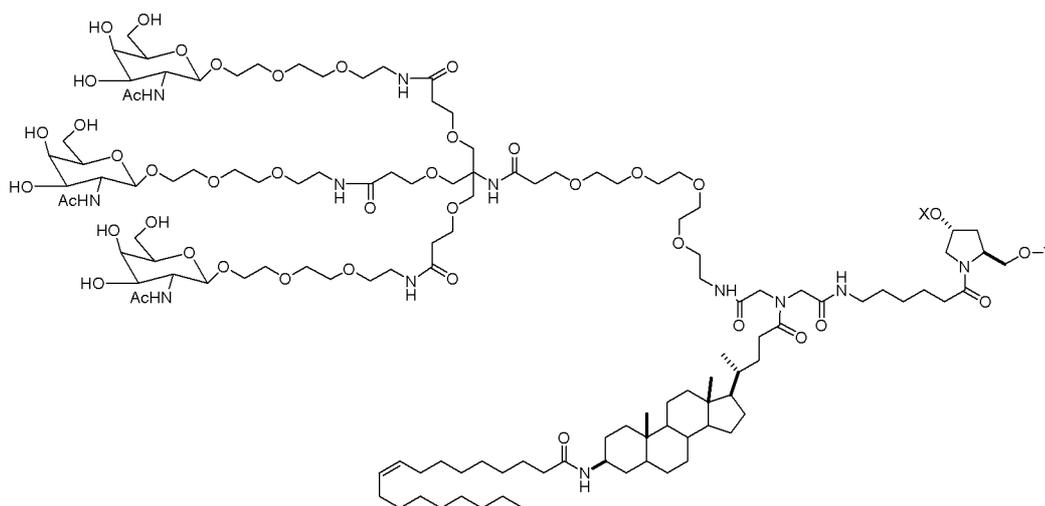
Согласно некоторым вариантам реализации агент РНКи присоединен к углеводному конъюгату посредством линкера, как показано на следующей схеме, где X представляет собой O или S



Согласно некоторым вариантам реализации агент РНКи конъюгирован с L96, как определено в Таблице 1 и показано ниже:

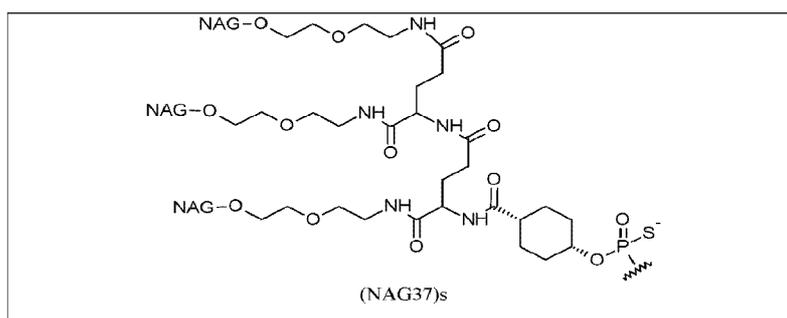


Другой типичный углеводный конъюгат для применения в вариантах реализации, описанных в настоящем документе, включает, но не ограничивается этим,



(Формула XXXVI), если один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

Согласно некоторым вариантам реализации подходящий лиганд представляет собой лиганд, раскрытый в WO 2019/055633, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Согласно одному варианту реализации лиганд содержит структуру, представленную ниже:



Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством одновалентного линкера. Согласно некоторым вариантам реализации GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством двухвалентного линкера. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством трехвалентного линкера.

Согласно одному варианту реализации двухцепочечные агенты РНК согласно настоящему изобретению содержат один или более GalNAc или производных GalNAc, присоединенных к агенту иРНК. GalNAc может быть присоединен к любому нуклеотиду посредством линкера на смысловой цепи или антисмысловой цепи. GalNAc может быть присоединен к 5'-концу смысловой цепи, 3'-концу смысловой цепи, 5'-концу антисмысловой цепи или 3'-концу антисмысловой цепи. Согласно одному варианту реализации GalNAc присоединен к 3'-концу смысловой цепи, например, посредством трехвалентного линкера.

Согласно другим вариантам реализации двухцепочечные агенты РНК согласно настоящему изобретению содержат множество (например, 2, 3, 4, 5 или 6) GalNAc или производных GalNAc, каждое из которых независимо присоединено к множеству нуклеотидов двухцепочечного агента РНК посредством множества линкеров, например, одновалентных линкеров.

Согласно некоторым вариантам реализации, например, если две цепи агента иРНК согласно настоящему изобретению являются частью одной более крупной молекулы и соединены непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи с образованием петли шпильки, содержащей множество неспаренных нуклеотидов, каждый неспаренный нуклеотид в петле шпильки может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенное посредством одновалентного линкера.

Согласно некоторым вариантам реализации углеводный конъюгат дополнительно содержит один или более дополнительных лигандов, описанных выше, таких как, но не ограничиваясь этим, модулятор ФК или пептид для проникновения в клетку.

Дополнительные углеводные конъюгаты и линкеры, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают те, которые описаны в РСТ публикации №№ WO 2014/179620 и WO 2014/179627, полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

D. Линкеры

Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат или лиганд, описанный в настоящем документе, может быть присоединен к олигонуклеотиду иРНК с помощью различных линкеров, которые могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми.

Термин «линкер» или «связывающая группа» означает органический фрагмент, который соединяет две части соединения, например, ковалентно соединяет две части соединения. Линкеры, как правило, содержат непосредственную связь или атом, такой как кислород или сера, звено, такое как NR₈, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH, или цепь атомов, таких как, но не ограничиваясь перечисленными, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил, алкинилгетероциклилалкил, алкинилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкинил,

алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, в которых один или более метиленов могут быть прерваны или оканчиваются O, S, S(O), SO₂, N(R₈), C(O), замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, или замещенный или незамещенный гетероцикл; где R₈ представляет собой водород, ацил, алифатическую или замещенную алифатическую группу. Согласно одному варианту реализации линкер представляет собой примерно 1-24 атома, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18, 7-17, 8-17, 6-16, 7-17 или 8-16 атомов.

Расщепляемая связывающая группа представляет собой группу, которая является достаточно стабильной за пределами клетки, но которая при попадании в целевую клетку расщепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживал вместе. Согласно примерному варианту реализации расщепляемая связывающая группа расщепляется по меньшей мере примерно в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или более, или по меньшей мере в 100 раз быстрее в целевой клетке или в первом референсном условии (которое может быть выбрано, например, для имитации или представления внутриклеточных условий), чем в крови субъекта, или во втором референсном условии (которое может быть выбрано, например, для имитации или представления условий, обнаруженных в крови или сыворотке крови).

Расщепляемые связывающие группы восприимчивы к расщепляющим агентам, например, рН, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию разрушающих молекул. Обычно расщепляющие агенты более распространены или обнаруживаются на более высоких уровнях или более активны внутри клеток, чем в сыворотке или крови. Примеры таких разрушающих агентов включают: окислительно-восстановительные агенты, которые выбраны для конкретных субстратов или которые не обладают субстратной специфичностью, включая, например, окисляющие или восстанавливающие ферменты или восстанавливающие агенты, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать расщепляемую в окислительно-восстановительных условиях связывающую группу путем восстановления; эстеразы; эндосомы или агенты, которые могут создавать кислую среду, например, те, которые приводят к рН, составляющему пять или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушать расщепляемую кислотой связывающую группу, действуя в качестве общей кислоты, пептидазы (которые могут быть субстрат-специфичными); и фосфатазы.

Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть восприимчивой к рН. рН сыворотки крови человека составляет 7,4, тогда как средний внутриклеточный рН немного ниже в диапазоне от примерно 7,1 до 7,3. Эндосомы имеют более кислый рН в диапазоне 5,5-6,0, и лизосомы имеют еще более кислый рН примерно 5,0. Некоторые линкеры будут иметь расщепляемую связывающую группу, которая расщепляется при выбранном рН, что высвобождает катионный липид из лиганда внутри клетки или в желаемый компартмент клетки.

Линкер может включать расщепляемую связывающую группу, которая может расщепляться конкретным ферментом. Тип расщепляемой связывающей группы, включенной в линкер, может зависеть от клетки, которая будет мишенью. Например, лиганд, нацеливающий на печень, может быть связан с катионным липидом посредством линкера, который включает сложноэфирную группу. Клетки печени богаты эстеразами, и поэтому линкер будет расщепляться более эффективно в клетках печени, чем в типах клеток, которые не богаты эстеразами. Другие типы клеток, богатые эстеразами, включают клетки легкого, кору почек и яички.

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

В целом, пригодность кандидатной расщепляемой связывающей группы можно оценить путем тестирования способности разрушающего агента (или условия) расщеплять кандидатную связывающую группу. Также будет желательным тестирование кандидатной расщепляемой связывающей группы на способность противостоять расщеплению в крови или при контакте с другой нецелевой тканью. Таким образом, можно определить относительную восприимчивость к расщеплению между первым и вторым условиями, где первое условие выбрано, как указывающее на расщепление в целевой клетке, а второе условие выбрано, как указывающее на расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например, в крови или сыворотке. Оценки можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в органной или тканевой культуре или у интактных животных. Может быть полезным проводить первоначальные оценки в бесклеточных или культуральных условиях и подтверждать путем дальнейших оценок у интактных животных. Согласно определенным вариантам реализации пригодные кандидатные соединения расщепляются по меньшей мере примерно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или в 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

і. Расщепляемые в окислительно-восстановительных условиях связывающие группы

Согласно определенным вариантам реализации расщепляемая связывающая группа представляет собой расщепляемую в окислительно-восстановительных условиях связывающую группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером расщепляемой в восстанавливающих условиях связывающей группы является дисульфидная связывающая группа (-S-S-). Чтобы определить, является ли кандидатная расщепляемая связывающая группа подходящей «расщепляемой в восстанавливающих условиях связывающей группой» или, например, подходит ли она для применения с конкретным фрагментом иРНК и конкретным нацеливающим агентом, можно обратить внимание на способы, описанные в настоящем документе. Например, кандидата можно оценить путем инкубации с дитиотреитолом (ДТТ) или другим восстанавливающим агентом с применением реагентов, известных в данной области техники, которые имитируют скорость расщепления, которая будет наблюдаться в клетке, например, целевой

клетке. Кандидатов также можно оценивать в условиях, которые выбраны для имитации условий крови или сыворотки. В одном варианте кандидатные соединения расщепляются в крови не более чем примерно на 10%. Согласно другим вариантам реализации пригодные кандидатные соединения разрушаются по меньшей мере примерно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или примерно в 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий). Скорость расщепления кандидатных соединений можно определить с помощью стандартных анализов ферментативной кинетики в условиях, выбранных для имитации внутриклеточной среды, и по сравнению с условиями, выбранными для имитации внеклеточной среды.

ii. Расщепляемые связывающие группы на основе фосфата

Согласно другим вариантам реализации расщепляемый линкер содержит расщепляемую связывающую группу на основе фосфата. Расщепляемая связывающая группа на основе фосфата расщепляется агентами, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Примером агента, который расщепляет фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как фосфатазы в клетках. Примерами связывающих групп на основе фосфата являются -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-, где Rk в каждом случае может независимо представлять собой C1-C20 алкил, C1-C20 галогеналкил, C6-C10 арил или C7-C12 аралкил. Примерные варианты реализации включают -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S- и -O-P(S)(H)-S-. Согласно определенным вариантам реализации связывающая группа на основе фосфата представляет собой -O-P(O)(OH)-O-. Указанных кандидатов можно оценивать с применением способов, аналогичных тем, которые описаны выше.

iii. Расщепляемые кислотой связывающие группы

Согласно другим вариантам реализации расщепляемый линкер содержит расщепляемую кислотой связывающую группу. Расщепляемая кислотой связывающая группа представляет собой связывающую группу, которая расщепляется в кислотных условиях. Согласно определенным вариантам реализации расщепляемые кислотой связывающие группы расщепляются в кислой среде с pH примерно 6,5 или ниже (например, примерно 6,0, 5,5, 5,0 или ниже), или агентами, такими как ферменты, которые могут действовать в качестве общей кислоты. В клетке специфические органеллы с низким pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечивать среду расщепления для расщепляемых кислотой связывающих групп. Примеры расщепляемых кислотой связывающих групп включают, но не ограничиваются перечисленными, гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Расщепляемые кислотой группы могут иметь общую формулу -C=NN-, C(O)O или -OC(O). В примерном варианте реализации углерод, присоединенный к

кислороду сложного эфира (алкоксигруппа), представляет собой арильную группу, замещенную алкильную группу или третичную алкильную группу, такую как диметилпентил или трет-бутил. Указанных кандидатов можно оценивать с применением способов, аналогичных тем, которые описаны выше.

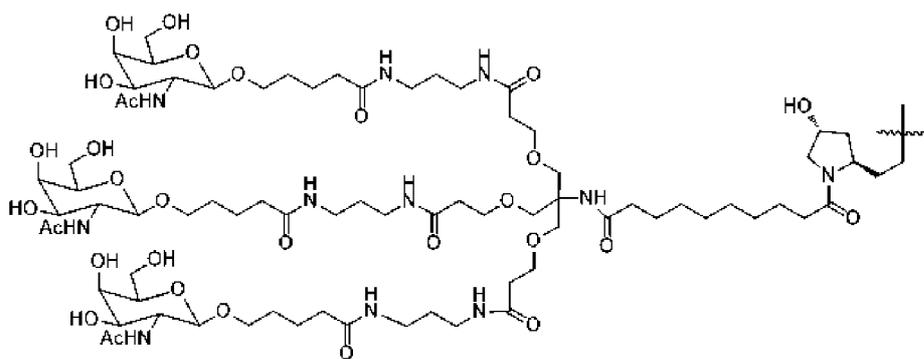
iv. Связывающие группы на основе сложного эфира

Согласно другим вариантам реализации расщепляемый линкер содержит расщепляемую связывающую группу на основе сложного эфира. Расщепляемая связывающая группа на основе сложного эфира расщепляется ферментами, такими как эстеразы и амидазы в клетках. Примеры расщепляемых связывающих групп на основе сложного эфира включают, но не ограничиваются перечисленными, сложные эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Расщепляемые связывающие группы на основе сложного эфира имеют общую формулу $-C(O)O-$ или $-OC(O)-$. Указанных кандидатов можно оценивать с применением способов, аналогичных тем, которые описаны выше.

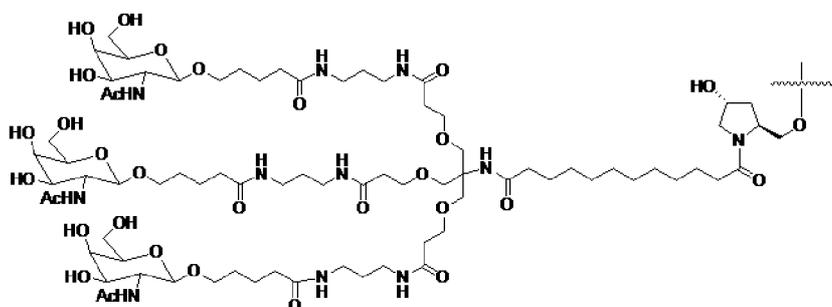
v. Расщепляемые группы на основе пептида

Согласно еще одному варианту реализации расщепляемый линкер содержит расщепляемую связывающую группу на основе пептида. Расщепляемая связывающая группа на основе пептида расщепляется ферментами, такими как пептидазы и протеазы в клетках. Расщепляемые связывающие группы на основе пептида представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами с получением олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т. д.) и полипептидов. Расщепляемые группы на основе пептида не включают амидную группу ($-C(O)NH-$). Амидная группа может быть образована между любым алкиленом, алкениленом или алкиниленом. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образующейся между аминокислотами с получением пептидов и белков. Расщепляемая группа на основе пептида обычно ограничена пептидной связью (т. е. амидной связью), образованной между аминокислотами с получением пептидов и белков, и не включает полную амидную функциональную группу. Расщепляемые связывающие группы на основе пептида имеют общую формулу $-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-$, где RA и RB представляют собой группы R двух смежных аминокислот. Указанных кандидатов можно оценивать с применением способов, аналогичных тем, которые описаны выше.

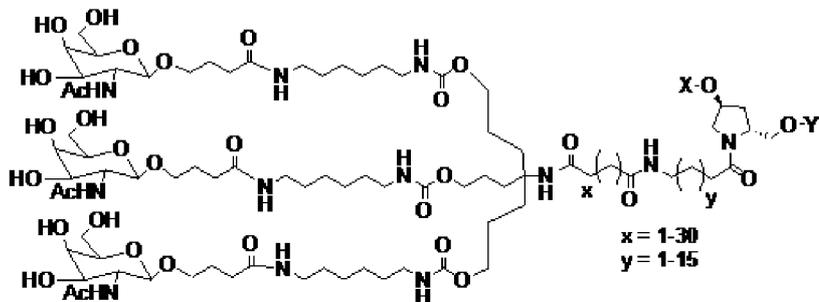
Согласно некоторым вариантам реализации иРНК согласно настоящему изобретению конъюгирована с углеводом посредством линкера. Неограничивающие примеры конъюгатов иРНК-углевод с линкерами композиций и способов согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются перечисленными,



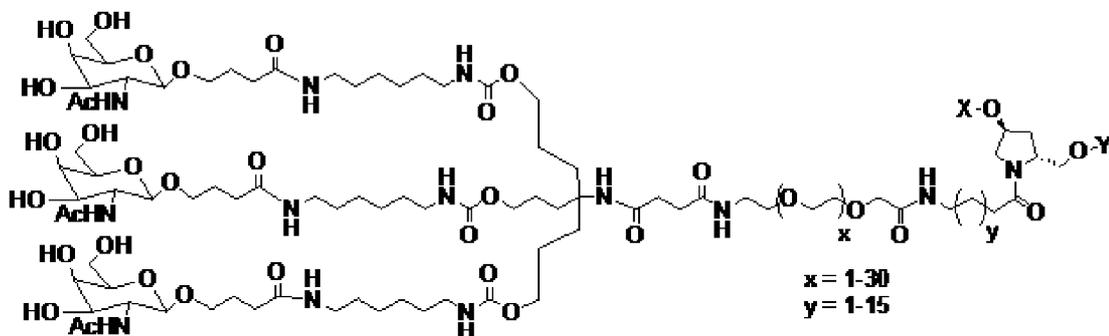
(Формула XXXVII),



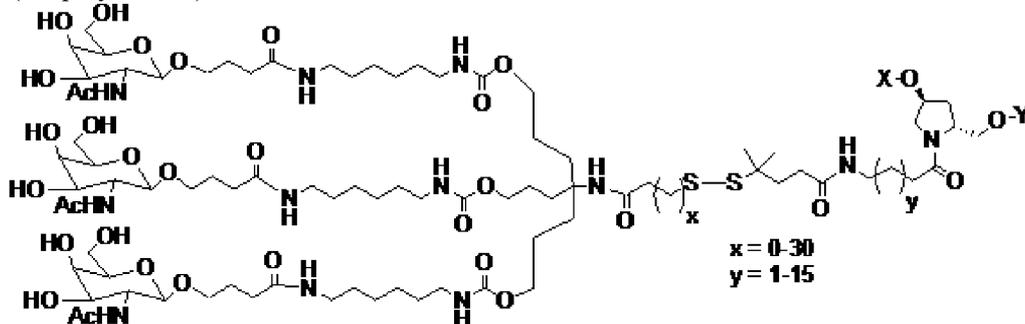
(Формула XXXVIII),



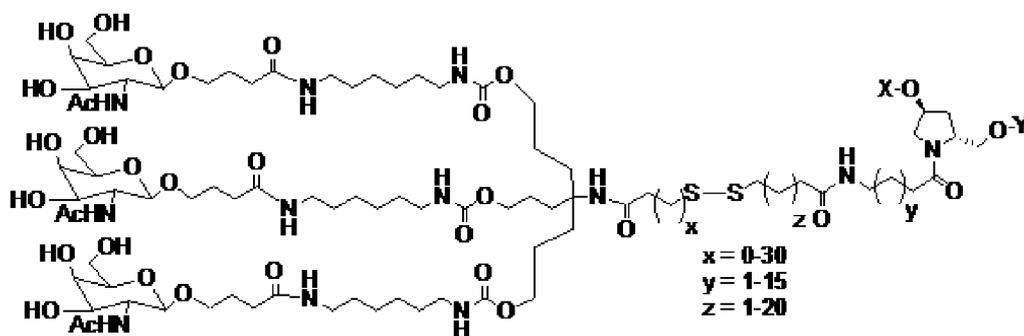
(Формула XXXIX),



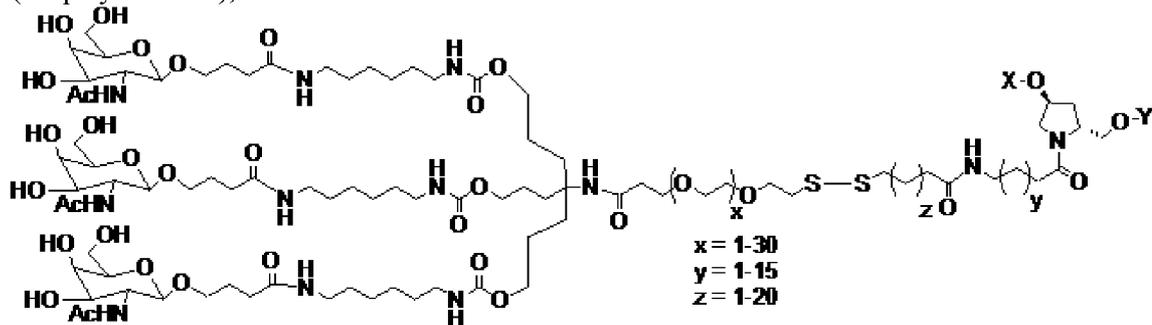
(Формула XL),



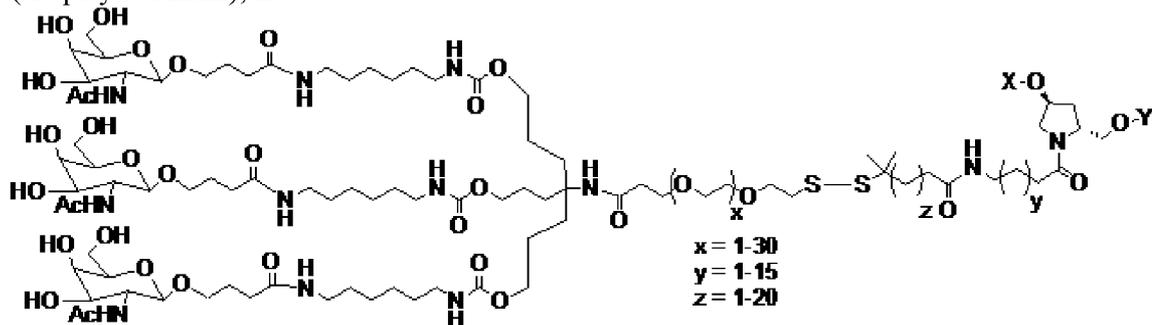
(Формула XLI),



(Формула XLII),



(Формула XLIII), и

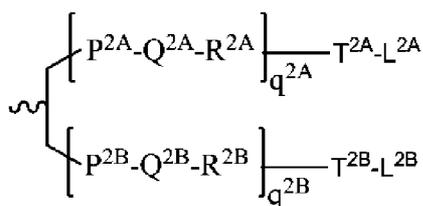


(Формула XLIV), если один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

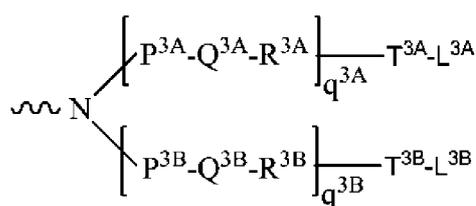
Согласно определенным вариантам реализации композиций и способов согласно настоящему изобретению лиганд представляет собой одно или более производных «GalNAc» (N-ацетилгалактозамина), присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

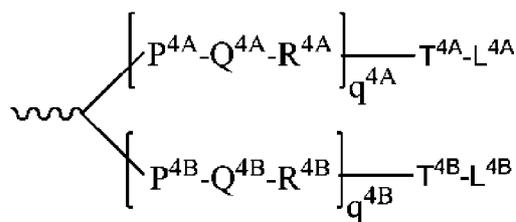
Согласно одному варианту реализации дцРНК согласно настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, показанных в любой из формул (XLV) - (XLVI):

Формула XXXV

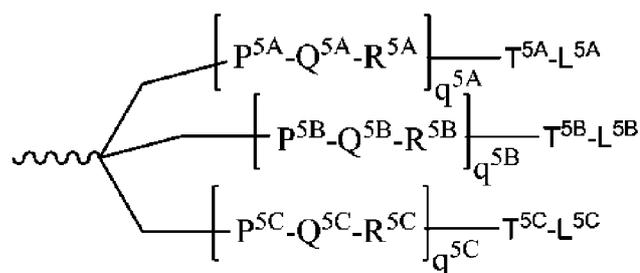


Формула XLVI





Формула XLVII



Формула XLVIII

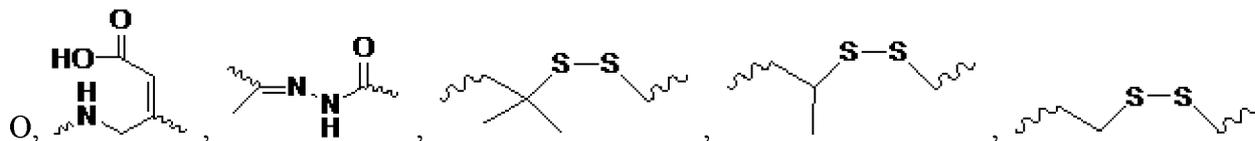
где:

q^{2A} , q^{2B} , q^{3A} , q^{3B} , q^{4A} , q^{4B} , q^{5A} , q^{5B} и q^{5C} представляют собой независимо для каждого случая 0-20, и где повторяющееся звено может быть одинаковым или отличающимся;

P^{2A} , P^{2B} , P^{3A} , P^{3B} , P^{4A} , P^{4B} , P^{5A} , P^{5B} , P^{5C} , T^{2A} , T^{2B} , T^{3A} , T^{3B} , T^{4A} , T^{4B} , T^{4A} , T^{5B} , T^{5C} каждый независимо для каждого случая отсутствует, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH или CH₂O;

Q^{2A} , Q^{2B} , Q^{3A} , Q^{3B} , Q^{4A} , Q^{4B} , Q^{5A} , Q^{5B} , Q^{5C} независимо для каждого случая отсутствуют, алкилен, замещенный алкилен, в котором один или более метиленов могут быть прерваны или терминированы одним или более из O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

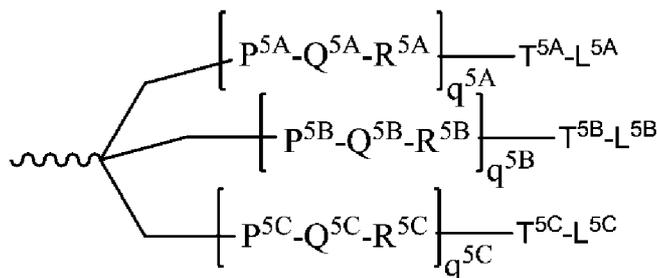
R^{2A} , R^{2B} , R^{3A} , R^{3B} , R^{4A} , R^{4B} , R^{5A} , R^{5B} , R^{5C} каждый независимо для каждого случая отсутствует, NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-



или гетероциклил;

L^{2A} , L^{2B} , L^{3A} , L^{3B} , L^{4A} , L^{4B} , L^{5A} , L^{5B} и L^{5C} представляют лиганд; т. е. каждый независимо для каждого случая представляет собой моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и R^a представляет собой H или боковую цепь аминокислоты. Трехвалентные конъюгирующие производные GalNAc особенно полезны для применения с агентами РНКи для ингибирования экспрессии целевого гена, например, те, которые имеют формулу (XLIX):

Формула XLIX



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

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп, конъюгирующих производные GalNAc, включают, но не ограничиваются перечисленными, структуры, приведенные выше как формулы II, VII, XI, X и XIII.

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

Не требуется, чтобы все положения в конкретном соединении были одинаково модифицированы, и в сущности более чем одна из вышеупомянутых модификаций может быть включена в одно соединение или даже в один нуклеозид в пределах иРНК. Настоящее изобретение также включает соединения иРНК, которые представляют собой химерные соединения.

«Химерные» соединения иРНК или «химеры» в контексте настоящего изобретения представляют собой соединения иРНК, такие как агенты дцРНКи, которые содержат две или более химически отличающихся областей, каждая из которых состоит из по меньшей мере одного мономерного звена, т. е. нуклеотида в случае соединения дцРНК. Указанные иРНК, как правило, содержат по меньшей мере одну область, в которой РНК модифицирована так, чтобы придать иРНК повышенную устойчивость к деградации нуклеазой, повышенное клеточное поглощение или повышенную аффинность связывания с целевой нуклеиновой кислотой. Дополнительная область иРНК может служить субстратом для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. В качестве примера, РНКазы H представляет собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет цепь РНК дуплекса РНК:ДНК. Таким образом, активация РНКазы H приводит к расщеплению целевой РНК, значительно повышая тем самым эффективность ингибирования иРНК экспрессии генов. Следовательно, сопоставимые результаты часто могут быть получены с более короткими иРНК при использовании химерных дцРНК по сравнению с гибридизацией фосфотиоатных дезокси-дцРНК с той же целевой областью. Расщепление целевой РНК можно рутинно детектировать с помощью гель-электрофореза и, при необходимости, связанных методик гибридизации нуклеиновых кислот, известных в данной области техники.

В определенных случаях РНК в случае иРНК может быть модифицирована группой, отличной от лиганда. Ряд молекул, отличных от лигандов, конъюгировали с иРНК с целью

повышения активности, клеточного распределения или клеточного поглощения иРНК, и процедуры для выполнения таких конъюгаций доступны в научной литературе. Такие фрагменты, отличные от лигандов, включали липидные фрагменты, такие как холестерин (Kubo, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), холевую кислоту (Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), простой тиозфир, например, гексил-S-тригилтиол (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), тиохолестерин (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), алифатическую цепь, например, додекандиоловый или ундецильный остаток (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49), фосфолипид, например, дигексадецил-рац-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969), или адамантануксусную кислоту (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), пальмитильный фрагмент (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), или фрагмент октадециламина или гексиламинокарбонилхолестерина (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Типичные патенты Соединенных Штатов Америки, в которых раскрыто получение таких конъюгатов РНК, перечислены выше. Типичные протоколы конъюгации включают синтез РНК, несущих амиолинкер в одном или более положениях последовательности. Затем проводят реакцию аминогруппы с конъюгируемой молекулой с использованием соответствующих реагентов для связывания или активации. Реакцию конъюгации можно выполнять либо с РНК, которая все еще связана с твердой подложкой, либо после отщепления РНК в фазе раствора. Очистка конъюгата РНК с помощью ВЭЖХ, как правило, обеспечивает получение чистого конъюгата.

IV. Доставка иРНК согласно настоящему изобретению

Доставка иРНК согласно настоящему изобретению в клетку, например, в клетку субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект, подверженный или у которого диагностировано с ANGPTL3-ассоциированное нарушение, например, нарушение метаболизма липидов) может быть достигнута с помощью ряда путей. Например, доставку можно выполнять путем приведения клетки в контакт с иРНК согласно настоящему изобретению как *in vitro*, так и *in vivo*. Доставку *in vivo* также можно выполнять непосредственно путем введения субъекту композиции, содержащей иРНК, например, дцРНК. В качестве альтернативы, доставку *in vivo* можно выполнять опосредованно путем введения одного или более векторов, которые кодируют и управляют экспрессией иРНК. Эти альтернативы более подробно обсуждаются ниже.

В целом, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) можно адаптировать для применения с иРНК согласно настоящему изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 и WO94/02595, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Для доставки

in vivo факторы, которые необходимо учитывать для доставки молекулы иРНК, включают, например, биологическую стабильность доставляемой молекулы, предотвращение неспецифических эффектов и накопление доставляемой молекулы в целевой ткани. Также было показано, что РНК-интерференция является успешной при локальной доставке в ЦНС с помощью прямой инъекции (Dorn, G., *et al.* (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH., *et al.* (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H., *et al.* (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., *et al.* (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., *et al.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya, Y., *et al.* (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602). Модификация РНК или фармацевтического носителя также может обеспечить нацеливание иРНК на ткань-мишень и избегание нежелательных нецелевых эффектов. Молекулы иРНК можно модифицировать путем химической конъюгации с липофильными группами, такими как холестерин, для повышения клеточного поглощения и предотвращения деградации. Например, иРНК, направленная против АроВ, конъюгированная с липофильным фрагментом холестерина, была инъецирована системно мышам и привела к нокдауну мРНК ароВ как в печени, так и в тощей кишке (Soutschek, J., *et al.* (2004) *Nature* 432:173-178).

Согласно альтернативному варианту реализации иРНК может быть доставлена с применением систем доставки лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки облегчают связывание молекулы иРНК (отрицательно заряженной), а также усиливают взаимодействия в отрицательно заряженной клеточной мембране, чтобы обеспечить эффективное поглощение иРНК клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут быть либо связаны с иРНК, либо индуцированы с образованием везикулы или мицеллы (см., например, Kim SH, *et al.* (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), в которой заключена иРНК. Образование везикул или мицелл дополнительно предотвращает деградацию иРНК при системном введении. Способы получения и введения комплексов катионное соединение-иРНК находятся в пределах возможностей специалиста в данной области техники (см., например, Sorensen, DR, *et al.* (2003) *J. Mol. Biol.* 327:761-766; Verma, UN, *et al.* (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS *et al.* (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственных средств, пригодных для системной доставки иРНК, включают DOTAP (Sorensen, DR., *et al.* (2003), выше; Verma, UN, *et al.* (2003), выше), «твердые частицы нуклеиновая кислота-липид» (Zimmermann, TS, *et al.* (2006) *Nature* 441:111-114), кардиолипин (Chien, PY, *et al.* (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A, *et al.* (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), полиэтиленимин (Bonnet ME, *et al.* (2008) *Pharm. Res.* Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), пептиды Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487) и полиамидоамины (Tomalia, DA, *et al.* (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., *et al.* (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). Согласно некоторым вариантам реализации иРНК образует комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции иРНК и циклодекстринов

можно найти в патенте США № 7427605, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Кодируемые вектором иРНК согласно настоящему изобретению

иРНК, нацеленная на ген ANGPTL3, может экспрессироваться из единиц транскрипции, встроенных в векторы ДНК или РНК (см., например, Couture, A, *et al.*, *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A, *et al.*, РСТ международную публикацию № WO 00/22113, Congrad, РСТ международную публикацию № WO 00/22114, и Congrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть кратковременной (порядка часов или недель) или устойчивой (от нескольких недель до нескольких месяцев или дольше) в зависимости от конкретной используемой конструкции и типа целевой ткани или клетки. Эти трансгены могут быть введены в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может представлять собой интегрирующийся или неинтегрирующийся вектор. Трансген также может быть сконструирован таким образом, чтобы обеспечить его наследование в качестве внехромосомной плазмиды (Gassmann, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

Вирусные векторные системы, которые можно применять со способами и композициями, описанными в настоящем документе, включают, но не ограничиваются перечисленными, (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, включая, но не ограничиваясь перечисленными, лентивирусные векторы, вирус лейкоза мышей Молони, и т.д.; (c) векторы на основе аденоассоциированного вируса; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (e) векторы SV 40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) пикорнавирусные векторы; (i) векторы на основе поксвирусов, такие как ортопоксвирус, например, векторы на основе вируса осповакцины или оспы птиц, например, оспы канареек или оспы птиц; и (j) хелпер-зависимый или «выпотрошенный» аденовирус. Дефектные по репликации вирусы также могут быть предпочтительными. Различные векторы будут включены в геном клеток, но не обязательно. При необходимости конструкции могут включать вирусные последовательности для трансфекции. В качестве альтернативы, конструкция может быть включена в векторы, способные к эписомальной репликации, например, векторы EPV и EBV. Конструкции для рекомбинантной экспрессии иРНК обычно будут требовать регуляторных элементов, например, промоторов, энхансеров и т. д., для обеспечения экспрессии иРНК в целевых клетках. Другие аспекты, которые следует учитывать для векторов и конструкций, известны в данной области техники.

V. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают иРНК согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие иРНК, описанную в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие иРНК, можно применять для предотвращения или лечения ANGPTL3-ассоциированного нарушения, например,

нарушения метаболизма липидов. Такие фармацевтические композиции изготавливают, исходя из способа доставки. Одним примером являются композиции, которые изготовлены для системного введения посредством парентеральной доставки, например, путем подкожной (SC), внутримышечной (IM) или внутривенной (IV) доставки. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена ANGPTL3.

Согласно некоторым вариантам реализации фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению являются стерильными. Согласно другому варианту реализации фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению не содержат пирогенов.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена ANGPTL3. В целом, подходящая доза иРНК согласно настоящему изобретению будет находиться в диапазоне от примерно 0,001 до примерно 200,0 миллиграммов на килограмм массы тела реципиента в сутки, обычно в диапазоне от примерно 1 до 50 мг на килограмм массы тела в сутки. Как правило, подходящая доза иРНК согласно настоящему изобретению будет находиться в диапазоне от примерно 0,1 мг/кг до примерно 5,0 мг/кг, например, примерно 0,3 мг/кг и примерно 3,0 мг/кг. Режим с повторными дозами может включать введение терапевтического количества иРНК на регулярной основе, например, ежемесячно, каждые 3-6 месяцев или один раз в год. Согласно определенным вариантам реализации иРНК вводят от примерно одного раза в месяц до примерно одного раза в шесть месяцев.

После начального режима лечения средства лечения можно вводить менее часто. Продолжительность лечения может быть определена на основании тяжести заболевания.

Согласно другим вариантам реализации однократная доза фармацевтических композиций может обладать длительным действием так, что дозы вводят с интервалами не более 1, 2, 3 или 4 месяцев. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения однократную дозу фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению вводят примерно один раз в месяц. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения однократную дозу фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению вводят ежеквартально (т. е. примерно каждые три месяца). Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения однократную дозу фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению вводят дважды в год (т. е. примерно один раз в шесть месяцев).

Специалист в данной области техники поймет, что на дозировку и временные рамки, необходимые для эффективного лечения субъекта, могут влиять определенные факторы, включая, но не ограничиваясь перечисленными, мутации, присутствующие у субъекта, предыдущие средства лечения, общее состояние здоровья или возраст субъекта, а также другие присутствующие заболевания. Кроме того, лечение субъекта профилактически или терапевтически эффективным количеством композиции, в зависимости от ситуации, может включать однократное введение или ряд введений.

иРНК могут быть доставлены таким образом, чтобы нацеливаться на конкретную ткань (например, гепатоциты).

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются перечисленными, растворы, эмульсии и составы, содержащие липосомы. Указанные композиции могут быть созданы из множества компонентов, которые включают, но не ограничиваются перечисленными, предварительно образованные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. Составы включают те, которые нацелены на печень.

Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению, которые могут быть удобно представлены в единичной лекарственной форме, могут быть получены в соответствии с общепринятыми методиками, хорошо известными в фармацевтической отрасли. Такие методики включают этап ассоциации активных ингредиентов с фармацевтическим(и) носителем(ями) или вспомогательным(и) веществом(ами). В целом, составы получают путем равномерного и тщательного соединения активных ингредиентов с жидким носителями.

А. Дополнительные составы

і. Эмульсии

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть получены и изготовлены в виде эмульсий. Эмульсии, как правило, представляют собой гетерогенные системы одной жидкости, диспергированной в другой в виде капель, обычно превышающих 0,1 мкм в диаметре (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi *et al.*, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Эмульсии часто представляют собой двухфазные системы, содержащие две несмешиваемые жидкие фазы, тщательно смешанные и диспергированные друг с другом. В целом, эмульсии могут быть типа «вода-в-масле» (в/м) или «масло-в-воде» (м/в). Если водная фаза тщательно распределена и диспергирована в виде мельчайших капель в объемной масляной фазе, полученная композиция называется эмульсией «вода-в-масле» (в/м). В качестве альтернативы, если масляная фаза тщательно распределена и диспергирована в виде мельчайших капель в объемной водной фазе, полученная композиция называется эмульсией «масло-в-воде» (м/в). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты в дополнение к диспергированным фазам, и активное лекарственное средство, которое может присутствовать в виде раствора либо в водной фазе, либо в масляной фазе, либо в виде отдельной фазы само по себе. Фармацевтические вспомогательные вещества, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты, также при необходимости

могут присутствовать в эмульсиях. Фармацевтические эмульсии также могут представлять собой множественные эмульсии, которые состоят более чем из двух фаз, такие как, например, эмульсии типа «масло-в-воде-в-масле» (м/в/м) и «вода-в-масле-в-воде» (в/м/в). Такие сложные составы часто обеспечивают определенные преимущества, которых не обеспечивают простые бинарные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные масляные капли эмульсии м/в заключают мелкие капли воды, представляют собой эмульсию в/м/в. Подобным образом, система масляных капель, заключенная в глобулы воды, стабилизированные в масляной непрерывной фазе, обеспечивает эмульсию м/в/м.

Эмульсии характеризуются незначительной термодинамической стабильностью или ее отсутствием. Часто диспергированная или прерывистая фаза эмульсии хорошо диспергирована во внешней или непрерывной фазе и поддерживается в этой форме посредством эмульгаторов или вязкости состава. Другие способы стабилизации эмульсий предусматривают применение эмульгаторов, которые могут быть включены в любую из фаз эмульсии. Эмульгаторы в широком смысле можно разделить на четыре категории: синтетические поверхностно-активные вещества, встречающиеся в природе эмульгаторы, абсорбирующие основы и мелкодисперсные твердые вещества (см., например, Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как поверхностно-активные агенты, нашли широкое применение при изготовлении эмульсий и рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Поверхностно-активные вещества, как правило, являются амфифильными и содержат гидрофильную и гидрофобную часть. Соотношение гидрофильного и гидрофобного характера поверхностно-активного вещества называется гидрофильно-липофильным балансом (HLB) и является ценным инструментом для классификации и отбора поверхностно-активных веществ при получении составов. Поверхностно-активные вещества можно разделить на различные классы в зависимости от характера гидрофильной группы: неионогенные, анионные, катионные и амфотерные (см., например, Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

Большой ряд неэмульгирующих материалов также включен в эмульсионные составы и вносит вклад в свойства эмульсий. К ним относятся жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, сложные эфиры жирных кислот, увлажнители, гидрофильные коллоиды, консерванты и антиоксиданты (Block, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Применение эмульсионных составов посредством дерматологического, перорального и парентерального путей и способы их изготовления рассмотрены в литературе (см., например, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

ii. Микроэмульсии

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения композиции иРНК и нуклеиновых кислот изготовлены в виде микроэмульсий. Микроэмульсия может быть определена как система воды, масла и амфифильного соединения, которая представляет собой единый оптически изотропный и термодинамически стабильный жидкий раствор (см., например, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Как правило, микроэмульсии представляют собой системы, которые получают путем сначала диспергирования масла в водном растворе поверхностно-активного вещества, а затем добавления достаточного количества четвертого компонента, обычно промежуточного среднецепочечного спирта с образованием прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также описаны как термодинамически стабильные, изотропно чистые дисперсии двух несмешиваемых жидкостей, которые стабилизированы с помощью межфазных пленок поверхностно-активных молекул (Leung and Shah, в: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215).

iii. Микрочастицы

иРНК согласно настоящему изобретению может быть включена в частицу, например, микрочастицу. Микрочастицы могут быть получены путем высушивания распылением, но также могут быть получены с помощью других способов, включающих лиофилизацию, выпаривание, высушивание в псевдооживленном слое, высушивание в вакууме или комбинацию этих методик.

iv. Усилители проникновения

Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении применяют различные усилители проникновения для обеспечения эффективной доставки нуклеиновых кислот, в частности, иРНК, в кожу животных. Большинство лекарственных средств

присутствует в растворе как в ионизированной, так и в неионизированной формах. Однако обычно только липидорастворимые или липофильные лекарственные средства легко пересекают клеточные мембраны. Было обнаружено, что даже нелипофильные лекарственные средства могут пересекать клеточные мембраны, если мембрану, подлежащую пересечению, обрабатывают усилителем проникновения. Помимо содействия диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны усилители проникновения также усиливают проникновение липофильных лекарственных средств.

Усилители проникновения могут быть классифицированы по принадлежности к одной из пяти широких категорий, т.е., поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие агенты и нехелатирующие вещества, отличные от ПАВ (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92). Каждый из упомянутых выше классов усилителей проникновения и их применение для изготовления фармацевтических композиций и доставки фармацевтических агентов хорошо известен в данной области техники.

v. Вспомогательные вещества

В отличие от соединения-носителя «фармацевтический носитель» или «вспомогательное вещество» представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующий агент или любой другой фармакологически инертный носитель для доставки одной или более нуклеиновых кислот животному. Вспомогательное вещество может быть жидким или твердым и выбрано с учетом планируемого способа введения с тем, чтобы обеспечить желаемый объем, консистенцию и т. д. при комбинировании с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Такой агент хорошо известен в данной области техники.

vi. Другие компоненты

Композиции согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, обычно встречающиеся в фармацевтических композициях, с их уровнями использования, установленными в данной области техники. Таким образом, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные материалы, такие как, например, противозудные средства, вяжущие средства, локальные анестетики или противовоспалительные агенты, или могут содержать дополнительные материалы, подходящие для физического изготовления различных лекарственных форм композиций согласно настоящему изобретению, такие как красители, вкусоароматические агенты, консерванты, антиоксиданты, замутнители, загущающие агенты и стабилизаторы. Однако такие материалы при добавлении не должны чрезмерно мешать разным видам биологической активности компонентов композиций согласно настоящему изобретению. Составы можно стерилизовать и, при необходимости, смешивать со вспомогательными агентами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими агентами, эмульгаторами, солями для корректировки осмотического давления, буферами, красителями, вкусоароматическими

веществами или ароматическими веществами и т. п., которые не вступают во вредные взаимодействия с нуклеиновой кислотой(кислотами) состава.

Водные суспензии могут содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, включая, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

Согласно некоторым вариантам реализации фармацевтические композиции, охарактеризованные в настоящем изобретении, включают (а) одну или более иРНК и (b) один или более агентов, которые функционируют посредством механизма, отличного от иРНК, и которые можно применять при лечении ANGPTL3-ассоциированного нарушения, например, нарушения метаболизма липидов.

Токсичность и профилактическую эффективность таких соединений можно определить с помощью стандартных фармацевтических процедур на культурах клеток или экспериментальных животных, например, для определения ЛД₅₀ (доза, летальная для 50% популяции) и ЭД₅₀ (доза, профилактически эффективная у 50% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс и может быть выражено как соотношение ЛД₅₀/ЭД₅₀. Соединения, для которых наблюдаются высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными.

Данные, полученные из анализов клеточных культур и исследований на животных, могут быть использованы при установлении диапазона дозировки для применения у людей. Дозировка композиций, охарактеризованных в настоящем документе, обычно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, которые включают ЭД₅₀, такую как ЭД₈₀ или ЭД₉₀, с незначительной токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в пределах указанного диапазона в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, применяемого в способах, охарактеризованных в настоящем изобретении, профилактически эффективную дозу можно первоначально оценить на основании анализов клеточной культуры. Доза может быть установлена в моделях на животных для достижения некоторого диапазона циркулирующих концентраций соединения в плазме или, при необходимости, полипептидного продукта целевой последовательности (например, для достижения уменьшенной концентрации полипептида), который включает ИК₅₀ (т. е. концентрацию тестируемого соединения, которая обеспечивает полумаксимальное ингибирование симптомов) или более высокие уровни ингибирования, определенные в культуре клеток. Такая информация может быть использована для более точного определения полезных доз у людей. Уровни в плазме можно измерить, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение к их введению, как обсуждалось выше, иРНК, охарактеризованные в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными агентами, используемыми для предотвращения или лечения ANGPTL3-ассоциированного нарушения, например, нарушения метаболизма липидов. В любом случае, врач, проводящий введение, может регулировать количество и время введения иРНК на

основании результатов, наблюдаемых при применении стандартных показателей эффективности, известных в данной области техники или описанных в настоящем документе.

VI. Способы ингибирования экспрессии ANGPTL3

Согласно настоящему изобретению также предложены способы ингибирования экспрессии гена ANGPTL3 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с агентом РНКи, например, агентом на основе двухцепочечной РНК, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии ANGPTL3 в клетке, что ингибирует экспрессию ANGPTL3 в клетке.

Приведение клетки в контакт с иРНК, например, агентом на основе двухцепочечной РНК, можно осуществлять *in vitro* или *in vivo*. Приведение клетки в контакт с иРНК *in vivo* включает приведение клетки или группы клеток в организме субъекта, например, субъекта-человека, в контакт с иРНК. Также возможны комбинации способов приведения клетки в контакт *in vitro* и *in vivo*. Приведение клетки в контакт может быть прямым или опосредованным, как обсуждалось выше. Кроме того, приведение клетки в контакт может быть выполнено посредством нацеливающего лиганда, включая любой лиганд, описанный в настоящем документе или известный в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации нацеливающий лиганд представляет собой углеводный фрагмент, например, лиганд GalNAc₃ или любой другой лиганд, который направляет агент РНКи к представляющему интерес сайту.

Термин «ингибирование» в контексте настоящего документа используется взаимозаменяемо со «снижением», «сайленсингом», «отрицательной регуляцией», «подавлением» и другими подобными терминами и включает любой уровень ингибирования.

Выражение «ингибирование экспрессии ANGPTL3» предназначено для обозначения ингибирования экспрессии любого гена ANGPTL3 (такого как, например, ген ANGPTL3 мыши, ген ANGPTL3 крысы, ген ANGPTL3 обезьяны или ген ANGPTL3 человека), а также вариантов или мутантов гена ANGPTL3. Таким образом, ген ANGPTL3 может представлять собой ген ANGPTL3 дикого типа, мутантный ген ANGPTL3 или трансгенный ген ANGPTL3 в контексте подвергнутой генетическим манипуляциям клетки, группы клеток или организма.

«Ингибирование экспрессии гена ANGPTL3» включает любой уровень ингибирования гена ANGPTL3, например, по меньшей мере частичное подавление экспрессии гена ANGPTL3. Экспрессию гена ANGPTL3 можно оценить на основании уровня или изменения уровня любой переменной, связанной с экспрессией гена ANGPTL3, например, уровня мРНК ANGPTL3 или уровня белка ANGPTL3. Экспрессию ANGPTL3 также можно оценить опосредованно на основании сывороточных уровней липидов, триглицеридов, холестерина (включая LDL-C, HDL-C, VLDL-C, IDL-C и общий холестерин) или свободных жирных кислот. Этот уровень можно оценить в отдельной

клетке или в группе клеток, включая, например, образец, полученный от субъекта. Понятно, что ANGPTL3 экспрессируется преимущественно в печени.

Ингибирование можно оценить по уменьшению абсолютного или относительного уровня одной или более переменных, которые ассоциированы с экспрессией ANGPTL3, по сравнению с контрольным уровнем. Контрольный уровень может представлять собой любой тип контрольного уровня, который используется в данной области техники, например, исходный уровень до введения дозы или уровень, определенный у подобного субъекта, клетки или образца, который не подвергают обработке или обрабатывают с помощью контроля (такого как, например, только контрольный буфер или контрольный неактивный агент).

Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению экспрессия гена ANGPTL3 ингибируется по меньшей мере на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или ниже уровня детектирования анализа. Согласно некоторым вариантам реализации экспрессия гена ANGPTL3 ингибируется по меньшей мере на 70%. Также понятно, что может быть желательным ингибирование экспрессии ANGPTL3 в определенных тканях, например, в печени, без значительного ингибирования экспрессии в других тканях, например, головном мозге. Согласно некоторым вариантам реализации уровень экспрессии определяют с применением способа анализа, предусмотренного в примере 2, с концентрацией иРНК 10 нМ в линии клеток, подходящей для соответствующего вида.

Согласно определенным вариантам реализации ингибирование экспрессии *in vivo* определяют путем нокдауна гена человека у грызуна, экспрессирующего ген человека, например, мышцы, инфицированной ААВ, экспрессирующей целевой ген человека (т.е., ANGPTL3), например, при введении в виде однократной дозы, например, при 3 мг/кг при наименьшей величине экспрессии РНК. Нокдаун экспрессии эндогенного гена в модельной системе на животных также может быть определен, например, после введения однократной дозы, например, 3 мг/кг при наименьшей величине экспрессии РНК. Такие системы применимы, если последовательности нуклеиновых кислот гена человека и гена модельного животного достаточно близки, так что иРНК человека обеспечивает эффективный нокдаун гена модельного животного. Экспрессию РНК в печени определяют с применением способов ПЦР, представленных в Примере 2.

Ингибирование экспрессии гена ANGPTL3 может проявляться снижением количества мРНК, экспрессируемой первой клеткой или группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном от субъекта), в которой ген ANGPTL3 транскрибируется и которая подвергается обработке (например, путем приведения клетки или клеток в контакт с иРНК согласно настоящему изобретению или путем введения иРНК согласно настоящему изобретению субъекту, у которого клетки присутствуют или присутствовали) таким образом, что экспрессия гена ANGPTL3 ингибируется по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичной первой клетке или группе клеток, но не подвергшейся такой обработке

(контрольная(ые) клетка(и), не обработанная(ые) иРНК или не обработанная(ые) иРНК, нацеленной на представляющий интерес ген). Согласно некоторым вариантам реализации ингибирование оценивают с помощью способа, представленного в Примере 2, с применением концентрации киРНК 10 нМ в линии клеток, соответствующей виду, и выражают уровень мРНК в обработанных клетках как процент от уровня мРНК в контрольных клетках с использованием следующей формулы:

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

Согласно другим вариантам реализации ингибирование экспрессии гена ANGPTL3 можно оценить по уменьшению параметра, который функционально связан с экспрессией гена ANGPTL3, например, уровня белка ANGPTL3 в крови или сыворотке крови от субъекта. Сайленсинг гена ANGPTL3 можно определить в любой клетке, экспрессирующей ANGPTL3, будь то эндогенный или гетерологичный из конструкции для экспрессии, и с помощью любого анализа, известного в данной области техники.

Ингибирование экспрессии белка ANGPTL3 может проявляться снижением уровня белка ANGPTL3, который экспрессируется клеткой или группой клеток или в образце от субъекта (например, уровня белка в образце крови, полученном от субъекта). Как объясняется выше, для оценки подавления мРНК ингибирование уровней экспрессии белка в обработанной клетке или группе клеток может быть аналогично выражено в виде процента от уровня белка в контрольной клетке или группе клеток или изменения уровня белка в образце от субъекта, например, в крови или сыворотке крови, полученной из него.

Контрольная клетка, группа клеток или образец от субъекта, которые можно применять для оценки ингибирования экспрессии гена ANGPTL3, включают клетку, группу клеток или образец от субъекта, которая(ый) еще не была(был) приведена(приведен) в контакт с агентом РНКи согласно настоящему изобретению. Например, контрольную клетку, группу клеток или образец от субъекта можно получить от отдельного субъекта (например, субъекта-человека или субъекта-животного) до лечения субъекта агентом РНКи, или контрольную популяцию, сопоставленную соответствующим образом.

Уровень мРНК ANGPTL3, которая экспрессируется клеткой или группой клеток, можно определить с помощью любого способа, известного в данной области техники для оценки экспрессии мРНК. Согласно одному варианту реализации уровень экспрессии ANGPTL3 в образце определяют путем детектирования транскрибированного полинуклеотида или его части, например, мРНК гена ANGPTL3. РНК может быть экстрагирована из клеток с применением методик экстракции РНК, включая, например, применение кислотной экстракции фенолом/гуанидинизотиоцианатом (RNAzol B; Biogenesis), с помощью наборов для получения РНК RNeasy™ (Qiagen®) или PAXgene™ (PreAnalytix™, Швейцария). Типичные форматы анализа, в которых применяется гибридизация рибонуклеиновых кислот, включают ядерные кинетические анализы, ОТ-ПЦР, анализы с защитой от РНКаз, Нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ* и анализ с использованием микромассива.

Согласно некоторым вариантам реализации уровень экспрессии ANGPTL3 определяют с применением зонда на основе нуклеиновой кислоты. Термин «зонд» в контексте настоящего документа относится к любой молекуле, которая способна селективно связываться с конкретным ANGPTL3. Зонды могут быть синтезированы специалистом в данной области техники или получены из соответствующих биологических препаратов. Зонды могут быть конкретно сконструированы так, чтобы содержать метку. Примеры молекул, которые можно применять в качестве зондов, включают, но не ограничиваются ими, РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

Выделенную мРНК можно применять в анализах гибридизации или амплификации, которые включают, но не ограничиваются перечисленными, Саузерн- и Нозерн-анализы, анализы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и массивы зондов. Один способ определения уровней мРНК включает приведение выделенной мРНК в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с мРНК ANGPTL3. Согласно одному варианту реализации мРНК иммобилизуют на твердой поверхности и приводят в контакт с зондом, например, путем прогона выделенной мРНК на агарозном геле и переноса мРНК из геля на мембрану, такую как нитроцеллюлоза. Согласно альтернативному варианту реализации зонд(ы) иммобилизуют на твердой поверхности и мРНК приводят в контакт с зондом(ами), например, в геном чиповом массиве Affymetrix®. Специалист в данной области техники может легко адаптировать известные способы детектирования мРНК для применения в определении уровня мРНК ANGPTL3.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии ANGPTL3 в образце включает процесс амплификации нуклеиновой кислоты или применение обратной транскриптазы (для получения кДНК), например, для мРНК в образце, например, с помощью ОТ-ПЦР (экспериментальный вариант реализации, изложенный в Mullis, 1987, патент США № 4683202), цепную лигазную реакцию (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), самоподдерживаемую репликацию последовательности (Guatelli *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), систему транскрипционной амплификации Kwoh *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-бета репликазу (Lizardi *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:1197), репликацию по типу катящегося кольца (Lizardi *et al.*, патент США № 5854033) или любой другой способ амплификации нуклеиновых кислот с последующим детектированием амплифицированных молекул с применением методик, хорошо известных специалистам в данной области техники. Эти схемы детектирования особенно полезны для детектирования молекул нуклеиновых кислот, если такие молекулы присутствуют в очень небольшом количестве. Согласно конкретным аспектам настоящего изобретения уровень экспрессии ANGPTL3 определяют с помощью количественной флуорогенной RT-PCR (т. е. системы TaqMan™). Согласно некоторым вариантам реализации уровень экспрессии определяют с помощью способа, предусмотренного в Примере 2, с использованием, например, концентрации кРНК 10 нМ в линии клеток, соответствующей виду.

Уровни экспрессии мРНК ANGPTL3 можно отслеживать с применением мембранного блоттинга (например, используемого в гибридизационном анализе, таком как Нозерн-, Саузерн-, дот-блот и т. п.), или микролунок, пробирок для образцов, гелей, гранул или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанные нуклеиновые кислоты). См. патенты США №№ 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Определение уровня экспрессии ANGPTL3 также может включать применение зондов на основе нуклеиновых кислот в растворе.

Согласно некоторым вариантам реализации уровень экспрессии мРНК оценивают с помощью анализов разветвленной ДНК (bdNA) или ПЦР в реальном времени (кПЦР). Применение этих способов описано и проиллюстрировано в примерах, представленных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации уровень экспрессии определяют с помощью способа, предусмотренного в Примере 2, с использованием концентрации кРНК 10 нМ в линии клеток, соответствующей виду.

Уровень экспрессии белка ANGPTL3 можно определить с применением любого способа, известного в данной области техники для измерения уровней белка. Такие способы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), тонкослойную хроматографию (ТСХ), гипердиффузионную хроматографию, реакции преципитации в жидкости или геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одинарную или двойную), иммуноэлектрофорез, Вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ИФА), иммунофлуоресцентные анализы, электрохемилюминесцентные анализы и т.п.

Согласно некоторым вариантам реализации эффективность способов согласно настоящему изобретению оценивают по уменьшению уровня мРНК ANGPTL3 или белка ANGPTL3 (например, при биопсии печени).

Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению иРНК вводят субъекту таким образом, что иРНК доставляется в конкретный сайт в организме субъекта. Ингибирование экспрессии ANGPTL3 можно оценить с помощью измерений уровня или изменения уровня мРНК ANGPTL3 или белка ANGPTL3 в образце, полученном из жидкости или ткани из конкретного места в организме субъекта (например, печени или крови).

В настоящем документе термины, относящиеся к детектированию или определению уровня аналита, следует понимать, как означающие выполнение этапов для определения присутствия материала, например, белка, РНК. В настоящем документе способы детектирования или определения включают детектирование или определение уровня аналита, который ниже уровня детектирования для используемого способа.

VII. Профилактические и терапевтические способы согласно настоящему изобретению

Согласно настоящему изобретению также предложены способы применения иРНК согласно настоящему изобретению или композиции, содержащей иРНК согласно настоящему изобретению, для ингибирования экспрессии ANGPTL3, что обеспечивает предотвращение или лечение ANGPTL3-ассоциированного нарушения, например, нарушения метаболизма липидов. В способах согласно настоящему изобретению клетка может быть приведена в контакт с кРНК *in vitro* или *in vivo*, т. е. клетка может находиться в организме субъекта.

Клетка, подходящая для обработки с применением способов согласно настоящему изобретению, может представлять собой любую клетку, которая экспрессирует ANGPTL3, например, клетку печени. Клетка, подходящая для применения в способах согласно настоящему изобретению, может представлять собой клетку млекопитающего, например, клетку примата (такую как клетка человека, включая клетку человека у химерного животного, отличного от человека, или клетку примата, отличного от человека, например, клетку обезьяны или клетку шимпанзе), или клетку, отличную от клетки примата. Согласно определенным вариантам реализации клетка представляет собой клетку человека, например, клетку печени человека. В способах согласно настоящему изобретению экспрессия ANGPTL3 ингибируется в клетке по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 или до уровня, ниже уровня детектирования анализа.

Способы *in vivo* согласно настоящему изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей иРНК, причем указанная иРНК включает нуклеотидную последовательность, которая комплементарна по меньшей мере части транскрипта РНК гена ANGPTL3 млекопитающего, которому должен быть введен агент РНКи. Композицию можно вводить с помощью любых способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь перечисленными, пероральный, внутривентрикулярный или парентеральный пути, включая внутривентрикулярное (например, интравентрикулярное, внутривентрикулярное и интратекальное), внутривенное, внутримышечное, подкожное, трансдермальное, воздушное (аэрозольное), назальное, ректальное и местное (включая буккальное и подъязычное) введение. Согласно определенным вариантам реализации композиции вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. Согласно определенным вариантам реализации композиции вводят путем подкожной инъекции. Согласно определенным вариантам реализации композиции вводят путем внутримышечной инъекции.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения также предложены способы ингибирования экспрессии гена ANGPTL3 у млекопитающего. Способы включают введение млекопитающему композиции, содержащей дцРНК, которая нацелена на ген ANGPTL3 в клетке млекопитающего и поддерживается у млекопитающего в течение времени, достаточного для дегградации транскрипта мРНК гена ANGPTL3, ингибируя тем самым экспрессию гена ANGPTL3 в клетке. Снижение экспрессии гена можно оценить с помощью любых способов, известных в данной области техники, и способов, например, кОТ-ПЦР, описанных в настоящем документе, например, в Примере 2. Снижение

продукции белка можно оценить с помощью любых способов, известных в данной области техники, например, ИФА. Согласно определенным вариантам реализации образец пункционной биопсии печени служит в качестве тканевого материала для отслеживания снижения экспрессии гена или белка ANGPTL3. Согласно другим вариантам реализации образец крови служит в качестве образца от субъекта для отслеживания снижения экспрессии белка ANGPTL3.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложены способы лечения субъекта, нуждающегося в этом, например, субъекта, у которого диагностировано ANGPTL3-ассоциированное нарушение, такое как нарушение метаболизма липидов. Согласно одному варианту реализации субъект, имеющий нарушение метаболизма липидов, имеет гиперлипидемию. Согласно другому варианту реализации субъект, имеющий нарушение метаболизма липидов, имеет гипертриглицеридемию.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложены способы профилактики у субъекта, нуждающегося в этом. Способы лечения согласно настоящему изобретению включают введение иРНК согласно настоящему изобретению субъекту, например, субъекту, который может получить пользу от снижения экспрессии ANGPTL3, в профилактически эффективном количестве дцРНК, нацеленной на ген ANGPTL3, или фармацевтической композиции, содержащей дцРНК, нацеленную на ген ANGPTL3.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложены способы лечения субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть получена польза от снижения экспрессии ANGPTL3, например, ANGPTL3-ассоциированное заболевание, такое как нарушение метаболизма липидов, например, гиперлипидемию или гипертриглицеридемию. Лечение субъекта, который может получить пользу от снижения и/или ингибирования экспрессии гена ANGPTL3, включает терапевтическое лечение (например, субъект имеет эруптивные ксантомы) и профилактическое лечение (например, субъект не имеет эруптивных ксантом, или субъект может быть подвержен риску развития эруптивных ксантом).

иРНК согласно настоящему изобретению можно вводить в виде «свободной иРНК». Свободную иРНК вводят в отсутствие фармацевтической композиции. «Голая» иРНК может находиться в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может содержать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. Согласно одному варианту реализации буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ). pH и осмолярность буферного раствора, содержащего иРНК, можно регулировать таким образом, чтобы он подходил для введения субъекту.

В качестве альтернативы, иРНК согласно настоящему изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, такой как липосомальный состав дцРНК.

Субъекты, которые могут получить пользу от ингибирования экспрессии гена ANGPTL3, представляют собой субъектов, подверженных развитию или у которых диагностировано ANGPTL3-ассоциированное нарушение, такое как нарушение метаболизма липидов, например, гиперлипидемия или гипертриглицеридемия. Согласно

одному варианту реализации способ включает введение композиции, охарактеризованной в настоящем документе, таким образом, что экспрессия целевого гена ANGPTL3 уменьшается, например, в течение примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 1-6, 1-3 или 3-6 месяцев на дозу. Согласно определенным вариантам реализации композицию вводят один раз в 3-6 месяцев.

Согласно одному варианту реализации иРНК, пригодные для способов и композиций, охарактеризованных в настоящем документе, специфично нацелены на РНК (первичную или процессированную) целевого гена ANGPTL3. Композиции и способы ингибирования экспрессии этих генов с применением иРНК можно получать и выполнять, как описано в настоящем документе.

Введение иРНК в соответствии со способами согласно настоящему изобретению может приводить к предотвращению или лечению ANGPTL3-ассоциированного нарушения, например, нарушения метаболизма липидов, например, гиперлипидемии или гипертриглицеридемии. Субъектам можно вводить терапевтическое количество иРНК, такое как от примерно 0,01 мг/кг до примерно 200 мг/кг.

Согласно одному варианту реализации иРНК вводят подкожно, т. е. путем подкожной инъекции. Одну или более инъекций можно применять для доставки субъекту желаемой дозы иРНК. Инъекции можно повторять в течение некоторого периода времени.

Введение можно повторять на регулярной основе. Согласно определенным вариантам реализации после начального режима лечения средства лечения можно вводить менее часто. Режим с повторными дозами может включать введение терапевтического количества иРНК на регулярной основе, например, от одного раза в месяц до одного раза в год. Согласно определенным вариантам реализации иРНК вводят от примерно одного раза в месяц до примерно одного раза в три месяца или от примерно одного раза в три месяца до примерно одного раза в шесть месяцев.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложены способы и варианты применения агента РНКи или его фармацевтической композиции для лечения субъекта, который может получить пользу в результате снижения и/или ингибирования экспрессии гена ANGPTL3, например, субъекта, имеющего ANGPTL3-ассоциированное заболевание, в комбинации с другими фармацевтическими средствами и/или другими терапевтическими способами, например, с известными фармацевтическими средствами и/или известными терапевтическими способами, такими как, например, те, которые в настоящее время используются для лечения этих нарушений.

Соответственно, согласно некоторым аспектам настоящего изобретения способы, которые включают любой отдельный агент иРНК согласно настоящему изобретению, дополнительно включают введение субъекту одного или более дополнительных терапевтических агентов.

Например, в определенных вариантах реализации иРНК, нацеленную на ANGPTL3, вводят в комбинации, например, с агентом, который можно применять в лечении нарушения метаболизма липидов. Например, дополнительные агенты, подходящие для лечения субъекта, который может получить пользу от снижения экспрессии ANGPTL3,

например, субъекта, имеющего нарушение метаболизма липидов, могут включать агенты, которые понижают уровень одного или более липидов сыворотки крови. Неограничивающие примеры таких агентов могут включать ингибиторы синтеза холестерина, такие как ингибиторы HMG-CoA-редуктазы, например, статины. Статины могут включать аторвастатин (липитор), флувастатин (лескол), ловастатин (мевакор), ловастатин пролонгированного действия (алтопрев), питавастатин (ливало), правастатин (правахол), розувастатин (крестор) и симвастатин (зокор). Другие агенты, которые можно применять при лечении нарушения метаболизма липидов, могут включать агенты, удерживающие желчь, такие как холестирамин и другие смолы; ингибиторы секреции VLDL, такие как ниацин; липофильные антиоксиданты, такие как пробукол; ингибиторы ацил-CoA-холестерин-ацилтрансферазы; антагонисты фарнезоидных X-рецепторов; активаторы белка, активирующего расщепление белка, связывающего регуляторный элемент стерола (SCAP); ингибиторы микросомального белка-переносчика триглицеридов (MTP); пептид, родственник ApoE; и терапевтические антитела против ANGPTL3. Дополнительные терапевтические агенты также могут включать агенты, которые повышают уровень липопротеинов высокой плотности (HDL), такие как ингибиторы белка, переносящего эфиры холестерина (CETP). Кроме того, дополнительные терапевтические агенты также могут включать пищевые добавки, например, рыбий жир. иРНК и дополнительные терапевтические агенты можно вводить одновременно и/или в одной и той же комбинации, например, парентерально, или дополнительный терапевтический агент можно вводить как часть отдельной композиции или в отдельные моменты времени и/или с помощью другого способа, известного в данной области техники или описанного в настоящем документе.

Агент иРНК и дополнительный терапевтический агент и/или средство лечения можно вводить одновременно и/или в одной и той же комбинации, например, парентерально, или дополнительный терапевтический агент можно вводить как часть отдельной композиции или в отдельные моменты времени и/или с помощью другого способа, известного в данной области техники или описанного в настоящем документе.

VIII. Наборы

Согласно определенным аспектам настоящего изобретения предложены наборы, которые включают подходящий контейнер, содержащий фармацевтический состав соединения киРНК, например, двухцепочечного соединения киРНК, или соединения киРНК, (например, предшественника, например, более крупного соединения киРНК, которое может быть процессировано в соединение киРНК, или ДНК, которая кодирует соединение киРНК, например, двухцепочечное соединение киРНК или соединение оциРНК, или его предшественника).

Такие наборы включают один или более агентов на основе дцРНК и инструкции по применению, например, инструкции по введению профилактически или терапевтически эффективного количества агента(ов) на основе дцРНК. Агент на основе дцРНК, может находиться во флаконе или предварительно заполненном шприце. Наборы могут

необязательно дополнительно содержать средства для введения агента на основе дцРНК (например, устройство для инъекции, такое как предварительно заполненный шприц), или средства для измерения ингибирования ANGPTL3 (например, средства для измерения ингибирования мРНК ANGPTL3, белка ANGPTL3 и/или активности ANGPTL3). Такие средства для измерения ингибирования ANGPTL3 могут включать средства для получения образца от субъекта, такого как, например, образец плазмы крови. Наборы согласно настоящему изобретению необязательно могут дополнительно содержать средства для определения терапевтически эффективного или профилактически эффективного количества.

Согласно определенным вариантам реализации отдельные компоненты фармацевтического состава могут быть обеспечены в одном контейнере, например, во флаконе или в предварительно заполненном шприце. В качестве альтернативы, может быть желательным обеспечение компонентов фармацевтического состава по отдельности в двух или более контейнерах, например, один контейнер для препарата соединения киРНК, и по меньшей мере другой для соединения-носителя. Набор может быть упакован в виде нескольких различных конфигураций, таких как один или более контейнеров в одной коробке. Разные компоненты можно объединять, например, в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к набору. Компоненты можно объединять в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, например, для приготовления и введения фармацевтической композиции. Набор также может включать устройство для доставки.

Настоящее раскрытие дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать как ограничение. Полное содержание всех ссылок, патентов и опубликованных заявок на патент, цитируемых в настоящей заявке, а также в составленном без соблюдения формальных требований Перечне последовательностей и Фигурах, включено тем самым в данный документ посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Синтез иРНК

Источник реагентов

Если источник реагента конкретно не указан в настоящем документе, такой реагент может быть получен от любого поставщика реагентов для молекулярной биологии при стандарте качества/чистоты для применения в молекулярной биологии.

Конструкция киРНК

киРНК, нацеленные на ген ангиопоэтин-подобного белка 3 человека (ANGPTL3) (человек: NCBI refseqID NM_014995.3 и NM_014995.2, NCBI GeneID: 27329), конструировали с применением пользовательских скриптов R и Python. Человеческая мРНК NM_014995.3 REFSEQ имеет длину 2951 основание. Человеческая мРНК NM_014995.2 REFSEQ имеет длину 2126 оснований.

Подробные перечни немодифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи ANGPTL3 показаны в Таблице 2. Подробные перечни

модифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи ANGPTL3 показаны в Таблице 3.

Следует понимать, что по всей заявке название дуплекса без десятичного разделителя эквивалентно названию дуплекса с десятичным разделителем, которое просто ссылается на номер партии дуплекса. Например, AD-959917 является эквивалентом AD-959917.1.

Синтез киРНК

киРНК конструировали, синтезировали и получали с применением способов, известных в данной области техники.

В общих чертах, последовательности киРНК синтезировали в масштабе 1 мкмоль с применением синтезатора Mermade 192 (BioAutomation) с использованием химии фосфорамидитов на твердых подложках. Твердая подложка представляла собой стекло с контролируемым размером пор (500-1000 Å), загруженное пользовательским лигандом GalNAc (конъюгаты 3'-GalNAc), универсальную твердую подложку (AM Chemicals) или первый нуклеотид, представляющий интерес. Вспомогательные синтетические реагенты и стандартные 2-цианоэтилфосфорамидитные мономеры (2'-дезоксид-2'-фтор, 2'-О-метил, РНК, ДНК) получали от Thermo-Fisher (Милуоки, Висконсин), HONGENE (Китай) или Chemgenes (Уилмингтон, Массачусетс, США). Дополнительные фосфорамидитные мономеры закупали у коммерческих поставщиков, получали на месте или закупали с использованием пользовательского синтеза у различных СМО. Фосфорамидиты получали в концентрации 100 мМ либо в ацетонитриле, либо в ацетонитриле:DMF 9:1 и связывали с применением 5-этилтио-1Н-тетразола (ETT, 0,25 М в ацетонитриле) со временем реакции 400 с. Фосфотиоатные связи создавали с использованием 100 мМ раствора 3-((диметиламинометилен)амино)-3Н-1,2,4-дитиазол-3-тиона (DDTT, полученного от Chemgenes (Уилмингтон, Массачусетс, США)) в безводном ацетонитриле/пиридине (9:1 об./об.). Время окисления было 5 минут. Все последовательности синтезировали с окончательным удалением группы DMT («DMT-Off»).

После завершения твердофазного синтеза олигорибонуклеотиды на твердой подложке обрабатывали 300 мкл метиламина (40% водный) при комнатной температуре в 96-луночных планшетах в течение приблизительно 2 часов, чтобы обеспечить отщепление от твердой подложки и последующие удаление всех дополнительных основолабильных защитных групп. Для последовательностей, содержащих любые природные рибонуклеотидные связи (2'-ОН), защищенные трет-бутилдиметилсилиловой группой (TBDMS), проводили вторую стадию удаления защитной группы с применением TEA.3HF (тригидрофторида триэтиламина). К раствору каждого олигонуклеотида в водном растворе метиламина добавляли 200 мкл диметилсульфоксида (DMSO) и 300 мкл TEA.3HF, и раствор инкубировали в течение приблизительно 30 минут при 60°C. После инкубации оставляли планшет остыть до комнатной температуры, и неочищенные олигонуклеотиды осаждали путем добавления 1 мл ацетонитрила:этанола в соотношении 9:1 или этанола:изопропанола в соотношении 1:1. Затем планшеты центрифугировали при 4°C в

течение 45 минут и надосадочную жидкость осторожно декантировали с помощью многоканальной пипетки. Осадок олигонуклеотидов ресуспендировали в 20 мМ NaOAc и затем обессоливали с использованием колонки для исключения по размеру HiTrap (5 мл, GE Healthcare) на системе для ЖХ от Agilent, оснащенной устройством автоматической подачи проб, УФ-детектором, измерителем электропроводности и коллектором фракции. Обессоленные образцы собирали в 96-луночные планшеты, а затем анализировали с помощью ЖХ-МС и УФ-спектрометрии для подтверждения идентичности и количественного определения количества материала, соответственно.

Дуплексирование отдельных цепей выполняли с помощью робота Tecan для работы с жидкими средами. Смысловые и антисмысловые отдельные цепи объединяли в эквимольном соотношении до конечной концентрации 10 мкМ в 1х ФСБ в 96-луночных планшетах, планшет запечатывали, инкубировали при 100°C в течение 10 минут, а затем позволяли медленно остыть до комнатной температуры в течение 2-3 часов. Концентрацию и идентичность каждого дуплекса подтверждали, а затем использовали для скрининговых анализов *in vitro*.

Пример 2. Способы скрининга *in vitro*

Культивирование и трансфекции клеток в 384-луночных планшетах

Для трансфекций первичные гепатоцитарные клетки яванской макаки (РСН) или клетки Нер3В (АТСС, Манассас, Виржиния) выращивали почти до конфлюентности при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в минимальной питательной среде Игла (Gibco), дополненной 10% ФБС (АТСС), перед отделением от планшетов путем трипсинизации. Трансфекцию проводили путем добавления 7,5 мкл Opti-MEM плюс 0,1 мкл липофектамина RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по каталогу 13778-150) к 2,5 мкл каждой дуплексной киРНК в отдельную лунку в 384-луночном планшете. Смесь затем инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Сорок мкл полной среды для роста без антибиотика, содержащей ~1,5×10⁴ клеток, затем добавляли к смеси киРНК. Клетки инкубировали в течение 24 часов до очистки РНК. Эксперименты с однократной дозой выполняли при конечной концентрации дуплекса 10 нМ, 1 нМ и 0,1 нМ.

Выделение общей РНК с помощью набора для выделения мРНК DYNABEADS (Invitrogen™, часть №: 610-12)

Клетки лизировали в 75 мкл буфера для лизиса/связывающего буфера, содержащего 3 мкл гранул, на лунку и перемешивали в течение 10 минут в электростатическом шейкере. Этапы промывания автоматизировали на Biotek EL406 с применением магнитной подложки для планшетов. Гранулы промывали (в 90 мкл) один раз в буфере А, один раз в буфере В и два раза в буфере Е с этапами аспирации между ними. После окончательной аспирации всю смесь объемом 10 мкл при КТ добавляли в каждую лунку, как описано ниже.

Синтез кДНК с использованием набора для обратной транскрипции кДНК высокой емкости ABI (Applied Biosystems, Фостер-сити, Калифорния, США, № по каталогу 4368813)

На лунку добавляли мастер-смесь из 1 мкл 10X буфера, 0,4 мкл 25X дНТФ, 1 мкл случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 6,6 мкл H₂O на реакцию. Планшеты запечатывали, содержимое перемешивали в течение 10 минут на электростатическом шейкере, а затем инкубировали при 37°C в течение 2 часов. После этого содержимое планшетов перемешивали при 80°C в течение 8 минут.

ПЦР в режиме реального времени

Два микролитра (мкл) кДНК добавляли к мастер-смеси, содержащей 0,5 мкл зонда GAPDH человека TaqMan (4326317E), 0,5 мкл человеческого ANGPTL3, 2 мкл воды, не содержащей нуклеаз, и 5 мкл мастер-смеси зонда Lightcycler 480 (Roche, № по каталогу 04887301001) на лунку в 384-луночных планшетах (Roche, № по каталогу 04887301001). ПЦР в режиме реального времени выполняли в системе для ПЦР в режиме реального времени LightCycler480 (Roche).

Для расчета относительного кратного изменения данные анализировали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ и нормировали к анализам, выполненным с клетками, трансфицированными 10 нМ AD-1955, или ложнотрансфицированными клетками. ИК₅₀ рассчитывали с использованием 4-параметрической аппроксимационной модели с использованием XLFit и нормировали к клеткам, трансфицированным AD-1955, или ложнотрансфицированным клеткам. Смысловая и бессмысловая последовательности AD-1955 представляют собой: смысловую последовательность `cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT` (SEQ ID NO: 27) и бессмысловую последовательность `UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT` (SEQ ID NO: 28).

Результаты скрининга однократной дозы агентов на основе дцРНК, перечисленных в Таблицах 2 и 3, в первичных гепатоцитах яванской макаки (PCH), показаны в Таблице 4.

Таблица 1. Сокращения нуклеотидных мономеров, используемые в представлении последовательности нуклеиновой кислоты. Следует понимать, что мономеры, присутствующие в олигонуклеотиде, взаимно связаны 5'-3'-фосфодиэфирными связями; и следует понимать, что если нуклеотид содержит 2'-фтор-модификацию, то фтор заменяет гидроксильную группу в этом положении в исходном нуклеотиде (т. е. это 2'-дезокси-2'-фторнуклеотид).

Сокращение	Нуклеотид(ы)
A	Аденозин-3'-фосфат
Ab	бета-L-аденозин-3'-фосфат
Abs	бета-L-аденозин-3'-фосфотиоат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-фтораденозин-3'-фосфотиоат
As	аденозин-3'-фосфотиоат
C	цитидин-3'-фосфат
Cb	бета-L-цитидин-3'-фосфат
Cbs	бета-L-цитидин-3'-фосфотиоат

Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфотиоат
Cs	цитидин-3'-фосфотиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gb	бета-L-гуанозин-3'-фосфат
Gbs	бета-L-гуанозин-3'-фосфотиоат
Gf	2'-фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-фторгуанозин-3'-фосфотиоат
Gs	гуанозин-3'-фосфотиоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
Ts	5-метилуридин-3'-фосфотиоат
U	Уридин-3'-фосфат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин-3'-фосфотиоат
Us	уридин-3'-фосфотиоат
N	любой нуклеотид, модифицированный или немодифицированный
a	2'-O-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-O-метиладенозин-3'-фосфотиоат
c	2'-O-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-O-метилцитидин-3'-фосфотиоат
g	2'-O-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-O-метилгуанозин-3'-фосфотиоат
t	2'-O-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-O-метил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
u	2'-O-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-O-метилуридин-3'-фосфотиоат
s	фосфотиоатная связь
L10	N-(холестеринкарбоксамидокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-Chol)

L96	<p>N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипролинол (Нур-(GalNAc-алкил)3)</p> <p style="text-align: center;"> $C_{78}H_{138}N_{11}O_{31}$ Exact Mass: 1724.9560 Mol. Wt.: 1725.9654 </p>
Y34	2-гидроксиметилтетрагидрофуран-4-метокси-3-фосфат (лишенная азотистого основания 2'-ОМе фураноза)
Y44	инvertированная лишенная азотистых оснований ДНК (2-гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат)
(Agn)	S-изомер аденозингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
(Cgn)	S-изомер цитидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
(Ggn)	S-изомер гуанозингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
(Tgn)	S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
P	Фосфат
VP	Винилфосфонат
dA	2'-дезоксаденозин-3'-фосфат
dAs	2'-дезоксаденозин-3'-фосфотиоат
dC	2'-дезоксцитидин-3'-фосфат
dCs	2'-дезоксцитидин-3'-фосфотиоат
dG	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат
dGs	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфотиоат
dT	2'-дезокситимидин-3'-фосфат
dTs	2'-дезокситимидин-3'-фосфотиоат
dU	2'-деоксиуридин
dUs	2'-деоксиуридин-3'-фосфотиоат
(C2p)	цитидин-2'-фосфат
(G2p)	гуанозин-2'-фосфат
(U2p)	уридин-2'-фосфат
(A2p)	аденозин-2'-фосфат
(Chd)	2'-О-гексадецилцитидин-3'-фосфат

(Ahd)	2'-О-гексадециладенозин-3'-фосфат
(Ghd)	2'-О-гексадецилгуанозин-3'-фосфат
(Uhd)	2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфат
s	фосфотиоат

Таблица 2. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК против ANGPTL3

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Название источника	Диапазон в NM_014495.3	Антисмысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Название источника	Диапазон в NM_014495.3
AD-133119 7.1	AUAAAAUGUUCACA AUUAAU	29	NM_014495. 3_75- 95_G21U_s	75-95	AUUAUUUGUGAACAUUU UUAUCU	138		73-95
AD-133119 8.1	UAAAAAUGUUCACAA UUAAGU	30	NM_014495. 3_76- 96_C21U_s	76-96	ACUUAUUUGUGAACAUU UUUAUC	139		74-96
AD-133119 9.1	AAAAAUGUUCACAAU UAAGCU	31	NM_014495. 3_77-97_s	77-97	AGCUUAAUUGUGAACAU UUUUAU	140		75-97
AD-133120 0.1	AAAUGUUCACAAUU AAGCUU	32	NM_014495. 3_78- 98_C21U_s	78-98	AAGCUUAAUUGUGAACAA UUUUUA	141		76-98
AD-133120 1.1	AAAUGUUCACAAUUA AGCUCU	33	NM_014495. 3_79- 99_C21U_s	79-99	AGAGCUTAAUUGUGAAC AUUUUU	142		77-99

AD-133120 2.1	AUGUUCACAAUUAAG CUCCUU	34	NM_014495. 3_81-101_s	81-101	AAGGAGCUUAAUUGUGA ACAUUU	143		79-101
AD-133120 3.1	UGUUCACAAUUAAGC UCCUUU	35	NM_014495. 3_82- 102_C21U_s	82-102	AAAGGAGCUUAAUUGUG AACAUU	144		80-102
AD-133120 4.1	GUUCACAAUUAAGCUC CUUCU	36	NM_014495. 3_83-103_s	83-103	AGAAGGAGCUUAAUUGU GAACAU	145		81-103
AD-133120 5.1	UUCACAAUUAAGCUCC UUCUU	37	NM_014495. 3_84-104_s	84-104	AAGAAGGAGCUUAAUUG UGAACA	146		82-104
AD-66977.2	UCACAAUUAAGCUCCU UCUUU	38		85-105	AAAGAAGGAGCUUAAU GUGAAC	147	NM_014495. 2_54-76_as	83-105
AD-133120 6.1	CACAAUUAAGCUCCUU CUUUU	39	NM_014495. 3_86-106_s	86-106	AAAAGAAGGAGCUUAAU UGUGAA	148		84-106
AD-133120 7.1	ACAAUUAAGCUCCUUC UUUUU	40	NM_014495. 3_87-107_s	87-107	AAAAAGAAGGAGCUUAA UUGUGA	149		85-107
AD-133120 8.1	CAAUUAAGCUCCUUCU UUUUU	41		88-108	AAAAAGAAGGAGCUUA AUUGUG	150		86-108

AD- 133120 9.1	AAUUAAGCUCCUUCUU UUUAU	42	NM_014495. 3_89-109_s	89-109	AUAAAAAGAAGGAGCUU AAUUGU	151		87-109
AD- 67003.3	AUUAAGCUCCUUCUUU UUAUU	43		90-110	AAUAAAAAGAAGGAGCU UAAUUG	152	NM_014495. 2_59-81_as	88-110
AD- 133121 0.1	UUAAGCUCCUUCUUUU UAUUU	44	NM_014495. 3_91- 111_G21U_s	91-111	AAAUAAAAAGAAGGAGC UUAUUU	153		89-111
AD- 133121 1.1	UAAGCUCCUUCUUUUU AUUGU	45	NM_014495. 3_92-112_s	92-112	ACAAUAAAAAGAAGGAG CUUAAU	154		90-112
AD- 133121 2.1	AAGCUCCUUCUUUUUA UUGUU	46	NM_014495. 3_93-113_s	93-113	AACAAUAAAAAGAAGGA GCUUAA	155		91-113
AD- 133121 3.1	AGCUCCUUCUUUUUAU UGUUU	47		94-114	AAACAAUAAAAAGAAGG AGCUUA	156		92-114
AD- 133121 4.1	GCUCCUUCUUUUUAUU GUUCU	48		95-115	AGAACAAUAAAAAGAAG GAGCUU	157		93-115
AD- 133121 5.1	CUCCUUCUUUUUAUUG UUCCU	49	NM_014495. 3_96-116_s	96-116	AGGAACAAUAAAAAGAA GGAGCU	158		94-116

AD- 133121 6.1	UCCUUCUUUUUAUUG UCCUU	50		97-117	AAGGAACAAUAAAAAGA AGGAGC	159		95-117
AD- 133121 7.1	CCUUCUUUUUAUUGU UCCUCU	51		98-118	AGAGGAACAAUAAAAAG AAGGAG	160		96-118
AD- 133121 8.1	CUUCUUUUUAUUGUU CCUCUA	52		99-119	UAGAGGAACAAUAAAA GAAGGA	161		97-119
AD- 133122 0.1	UCUUUUUAUUGUCC UCUAGU	53	NM_014495. 3_101-121_s	101-121	ACUAGAGGAACAAUAAA AAGAAG	162		99-121
AD- 133122 1.1	CUUUUUAUUGUCCUC UAGUU	54	NM_014495. 3_102-122_s	102-122	AACUAGAGGAACAAUAA AAAGAA	163		100-122
AD- 133122 2.1	UUUUUAUUGUCCUC UAGUUU	55		103-123	AAACUAGAGGAACAAUA AAAAGA	164		101-123
AD- 133122 3.1	UUUUAUUGUCCUCU AGUUAU	56	NM_014495. 3_104-124_s	104-124	AUAACUAGAGGAACAAU AAAAAG	165		102-124

AD- 133122 4.1	AUUUCAAAAACUCAAC AUAUU	57	NM_014495. 3_293-313_s	293-313	AAUATGTUGAGUUUUUG AAAUAU	166		291-313
AD- 133122 5.1	UUUCAAAAACUCAACA UAUUU	58	NM_014495. 3_294-314_s	294-314	AAAUAUGUUGAGUUUUU GAAUAU	167		292-314
AD- 133122 6.1	UUCAAAAACUCAACAU AUUUU	59		295-315	AAAUAUGUUGAGUUUU UGAAAU	168		293-315
AD- 133122 7.1	UCAAAAACUCAACAUA UUUGU	60		296-316	ACAAUAUGUUGAGUUU UUGAAA	169		294-316
AD- 133122 8.1	CAAAAACUCAACAUAU UUGAU	61	NM_014495. 3_297-317_s	297-317	AUCAAAUAUGUUGAGUU UUUGAA	170		295-317
AD- 133122 9.1	AAAAACUCAACAUAU UUGAUU	62	NM_014495. 3_298- 318_C21U_s	298-318	AAUCAAAUAUGUUGAGU UUUUGA	171		296-318
AD- 133123 0.1	AAAACUCAACAUAUU UGAUCU	63		299-319	AGAUCAAAUAUGUUGAG UUUUUG	172		297-319

AD- 133123 1.1	AAACUCAACAUUUU GAUCAU	64	NM_014495. 3_300- 320_G21U_s	300-320	AUGATCAAUAUGUUGA GUUUUU	173		298-320
AD- 133123 2.1	AACUCAACAUUUUG AUCAGU	65	NM_014495. 3_301-321_s	301-321	ACUGAUCAAAUAUGUUG AGUUUU	174		299-321
AD- 133123 3.1	ACUCAACAUUUUGA UCAGUU	66	NM_014495. 3_302- 322_C21U_s	302-322	AACUGATCAAUAUGUU GAGUUU	175		300-322
AD- 133123 4.1	UCAACAUUUUGAUC AGUCUU	67	NM_014495. 3_304-324_s	304-324	AAGACUGAUCAAAUAUG UUGAGU	176		302-324
AD- 67031.2	CAACAUUUUGAUCA GUCUUU	68		305-325	AAAGACUGAUCAAAUAU GUUGAG	177	NM_014495. 2_274- 296_as	303-325
AD- 133123 5.1	AACAUUUUGAUCAG UCUUUU	69	NM_014495. 3_306-326_s	306-326	AAAAGACUGAUCAAAUA UGUUGA	178		304-326
AD- 65695.2 2	ACAUAUUUGAUCAGU CUUUUU	70		307-327	AAAAAGACUGAUCAAAU AUGUUG	179	NM_014495. 2_276- 298_as	305-327

AD- 133123 6.1	CAUAUUUGAUCAGUC UUUUUU	71		308-328	AAAAAAGACUGAUCAAA UAUGUU	180		306-328
AD- 133123 7.1	AUAUUUGAUCAGUCU UUUUAU	72	NM_014495. 3_309-329_s	309-329	AUAAAAAGACUGAUCAA AUAUGU	181		307-329
AD- 133123 8.1	UAUUUGAUCAGUCUU UUUAUU	73	NM_014495. 3_310- 330_G21U_s	310-330	AAUAAAAAGACUGAUC AAUAUG	182		308-330
AD- 133123 9.1	AUUUGAUCAGUCUUU UUAUGU	74		311-331	ACAUAAAAAGACUGAUC AAUAUU	183		309-331
AD- 133124 0.1	UUUGAUCAGUCUUUU UAUGAU	75	NM_014495. 3_312-332_s	312-332	AUCAUAAAAAGACUGAU CAAUAU	184		310-332
AD- 133124 1.1	UUGAUCAGUCUUUUU AUGAUU	76	NM_014495. 3_313- 333_C21U_s	313-333	AAUCAUAAAAAGACUGA UCAAAU	185		311-333
AD- 133124 2.1	UGAUCAGUCUUUUUA UGAUCU	77	NM_014495. 3_314-334_s	314-334	AGAUCATAAAAAGACUG AUCAAA	186		312-334

AD- 133124 3.1	GAUCAGUCUUUUUUAU GAUCUA	78	NM_014495. 3_315-335_s	315-335	UAGATCAUAAAAAGACU GAUCAA	187		313-335
AD- 133124 4.1	AUCAGUCUUUUUAUG AUCUAU	79	NM_014495. 3_316-336_s	316-336	AUAGAUCAUAAAAAGAC UGAUCA	188		314-336
AD- 133124 5.1	UCAGUCUUUUUAUGA UCUAUU	80	NM_014495. 3_317- 337_C21U_s	317-337	AAUAGATCAUAAAAAGA CUGAUC	189		315-337
AD- 133124 6.1	CAGUCUUUUUAUGAU CUAUCU	81	NM_014495. 3_318- 338_G21U_s	318-338	AGAUAGAUCAUAAAAAG ACUGAU	190		316-338
AD- 133124 7.1	AGUCUUUUUAUGAUC UAUCGU	82	NM_014495. 3_319- 339_C21U_s	319-339	ACGAUAGAUCAUAAAAA GACUGA	191		317-339
AD- 133124 8.1	GUCUUUUUAUGAUCU AUCGCU	83	NM_014495. 3_320-340_s	320-340	AGCGAUAGAUCAUAAAA AGACUG	192		318-340
AD- 133124 9.1	UCUUUUUAUGAUCUA UCGCUU	84	NM_014495. 3_321- 341_G21U_s	321-341	AAGCGAUAGAUCAUAAA AAGACU	193		319-341

AD- 133125 0.1	CUUUUUAUGAUCUAU CGCUGU	85	NM_014495. 3_322- 342_C21U_s	322-342	ACAGCGAUAGAUCAUAA AAAGAC	194		320-342
AD- 133125 1.1	AACUCCAGAACACCCA GAAGU	86	NM_014495. 3_542-562_s	542-562	ACUUCUGGGUGUUCUGG AGUUUC	195		540-562
AD- 133125 2.1	ACUCCAGAACACCCAG AAGUA	87	NM_014495. 3_543-563_s	543-563	UACUTCTGGGUGUUCUG GAGUUU	196		541-563
AD- 133125 3.1	CUCCAGAACACCCAGA AGUAA	88	NM_014495. 3_544-564_s	544-564	UUACTUCUGGGUGUUCU GGAGUU	197		542-564
AD- 133125 4.1	UCCAGAACACCCAGAA GUAAU	89	NM_014495. 3_545- 565_C21U_s	545-565	AUUACUTCUGGGUGUUC UGGAGU	198		543-565
AD- 133125 5.1	CCAGAACACCCAGAAG UAACU	90	NM_014495. 3_546-566_s	546-566	AGUUACTUCUGGGUGUU CUGGAG	199		544-566
AD- 133125 6.1	CAGAACACCCAGAAGU AACUU	91	NM_014495. 3_547-567_s	547-567	AAGUTACUUCUGGGUGU UCUGGA	200		545-567

AD- 133125 7.1	AGAACACCCAGAAGUA ACUUU	92	NM_014495. 3_548- 568_C21U_s	548-568	AAAGUUACUUCUGGGUG UUCUGG	201		546-568
AD- 133125 8.1	GAACACCCAGAAGUAA CUUCA	93	NM_014495. 3_549-569_s	549-569	UGAAGUTACUUCUGGGU GUUCUG	202		547-569
AD- 133125 9.1	AACACCCAGAAGUAAC UUCAU	94	NM_014495. 3_550- 570_C21U_s	550-570	AUGAAGTUACUUCUGGG UGUUCU	203		548-570
AD- 133126 0.1	ACACCCAGAAGUAACU UCACU	95	NM_014495. 3_551-571_s	551-571	AGUGAAGUUACUUCUGG GUGUUC	204		549-571
AD- 133126 1.1	CACCCAGAAGUAACUU CACUU	96	NM_014495. 3_552-572_s	552-572	AAGUGAAGUUACUUCUG GGUGUU	205		550-572
AD- 133126 2.1	ACCCAGAAGUAACUUC ACUUU	97		553-573	AAAGUGAAGUUACUUCU GGGUGU	206		551-573
AD- 133126 3.1	CCCAGAAGUAACUUCA CUUAA	98	NM_014495. 3_554-574_s	554-574	UUAAGUGAAGUUACUUC UGGGUG	207		552-574

AD- 133126 4.1	CCAGAAGUAACUUCAC UAAAA	99	NM_014495. 3_557-576_s	555-575	UUUAAGTGAAGUUACUU CUGGGU	208		553-575
AD- 133126 5.1	CAGAAGUAACUUCACU UAAAA	100	NM_014495. 3_556-576_s	556-576	UUUUAAGUGAAGUUACU UCUGGG	209		554-576
AD- 133126 6.1	AGAAGUAACUUCACU UAAAAU	101	NM_014495. 3_557- 577_C21U_s	557-577	AUUUUAAGUGAAGUUAC UUCUGG	210		555-577
AD- 133126 7.1	GAAGUAACUUCACUU AAAACU	102	NM_014495. 3_558-578_s	558-578	AGUUUUAAGUGAAGUUA CUUCUG	211		556-578
AD- 133126 8.1	AAGUAACUUCACUUA AAACUU	103	NM_014495. 3_559-579_s	559-579	AAGUUUUAAGUGAAGUU ACUUCU	212		557-579
AD- 133126 9.1	AGUAACUUCACUUA AACUUU	104	NM_014495. 3_560-580_s	560-580	AAAGUUUUAAGUGAAGU UACUUC	213		558-580
AD- 133127 0.1	GUAACUUCACUAAAA ACUUUU	105	NM_014495. 3_561-581_s	561-581	AAAAGUUUUAAGUGAAG UUACUU	214		559-581

AD- 133127 1.1	UAACUUCACUUAAAAC UUUUU	106		562-582	AAAAAGUUUUAAGUGAA GUUACU	215		560-582
AD- 133127 2.1	AACUUCACUUAAAACU UUUGU	107	NM_014495. 3_563-583_s	563-583	ACAAAAGUUUUAAGUGA AGUUAC	216		561-583
AD- 133127 3.1	ACUUCACUUAAAACUU UUGUU	108		564-584	AACAAAAGUUUUAAGUG AAGUUA	217		562-584
AD- 133127 4.1	CUUCACUUAAAACUUU UGUAU	109	NM_014495. 3_565- 585_G21U_s	565-585	AUACAAAAGUUUUAAGU GAAGUU	218		563-585
AD- 133127 5.1	UUCACUUAAAACUUU UGUAGU	110		566-586	ACUACAAAAGUUUUAAG UGAAGU	219		564-586
AD- 133127 6.1	UCACUUAAAACUUUU GUAGAU	111		567-587	AUCUACAAAAGUUUUA GUGAAG	220		565-587
AD- 133127 7.1	CACUUAAAACUUUUG UAGAAA	112	NM_014495. 3_570-589_s	568-588	UUUCTACAAAAGUUUUA AGUGAA	221		566-588

AD- 133127 8.1	ACUUAAAACUUUUGU AGAAAA	113	NM_014495. 3_569-589_s	569-589	UUUUCUACAAAAGUUUU AAGUGA	222		567-589
AD- 133127 9.1	AAUGUUCACAAUUA GCUCCU	114		80-100	AGGAGCTUAAUTGUGAA CAUUUU	223		78-100
AD- 133128 0.1	AUUUGCUAUGUUAGA CGAUGU	115		188-208	ACAUCGTCUAACAUAAGC AAAUCU	224		186-208
AD- 133128 1.1	UUGCUAUGUUAGACG AUGUAA	116		190-210	UTACAUCGUCUAACAUA GCAAAU	225		188-210
AD- 133128 2.1	UGCUAUGUUAGACGA UGUAAA	117		191-211	UTUACATCGUCTAACAU GCAAA	226		189-211
AD- 133128 3.1	AACUGAGAAGAACUA CAUUA	118		373-393	UAUATGTAGUUCUUCUC AGUCC	227		371-393
AD- 133128 4.1	AACCAACAGCAUAGUC AAUA	119		648-668	UAUUTGACUAUGCUGUU GGUUUA	228		646-668

AD- 133128 5.1	CCCACAGAAUUUCUC UAUCU	120		711-731	AGAUAGAGAAATUUCUG UGGGUU	229		709-731
AD- 133128 6.1	CAGGUAGUCCAUGGAC AUUAA	121		913-933	UTAATGTCCAUGGACUAC CUGAU	230		911-933
AD- 133128 7.1	GGUAGUCCAUGGACA UUAUU	122		915-935	AAUUAATGUCCAUGGAC UACCUG	231		913-935
AD- 133128 8.1	AGUUGGAAGACUGGA AAGACA	123		1081-1101	UGUCTUTCCAGTCUCCA ACUCA	232		1079-1101
AD- 133128 9.1	UGGAAAGACAACAAA CAUUAU	124		1092-1112	ATAATGTUUGUTGUCUU UCCAGU	233		1090-1112
AD- 133129 0.1	UUUACUUGGGAAAUC ACGAAA	125		1126-1146	UTUCGUGAUUCCCAAG UAAAAA	234		1124-1146
AD- 133129 1.1	GGGAAAUCACGAAACC AACUA	126		1133-1153	UAGUTGGUUUCGUGAUU UCCCAA	235		1131-1153

AD- 133129 2.1	GAAAUCACGAAACCAA CUAUA	127		1135-1155	UAUAGUTGGUUTCGUGA UUUCCC	236		1133-1155
AD- 133129 3.1	CGAAACCAACUAUACG CUACA	128		1142-1162	UGUAGCGUAUAGUUGGU UUCGUG	237		1140-1162
AD- 133129 4.1	AUCAACCAAAAUGUU GAUCCA	129		1415-1435	UGGATCAACAUTUUGGU UGAUUU	238		1413-1435
AD- 133129 5.1	UAAAAACUCUAAACU UGACUA	130		1850-1870	UAGUCAAGUUUTGAGUU UUAACA	239		1848-1870
AD- 133129 6.1	CAAAACUUGAAAGCCU CCUAU	131		445-465	ATAGGAGGCUUTCAGU UUUGAG	240		443-465
AD- 133129 7.1	UCAACAUCGAAUAGA UGGAUU	132		935-955	AAUCCATCUAUTCGAUG UUGAAU	241		933-955
AD- 133129 8.1	CAAAACUUCAAUGAA ACGUGU	133		957-977	ACACGUTUCAUTGAAGU UUUGUG	242		955-977

AD- 133129 9.1	AAUCACGAAACCAACU AUACU	134		1137-1157	AGUATAGUUGGTUUCGU GAUUUC	243		1135-1157
AD- 133130 0.1	GGGAAUCAAUUUUAG AUGGUU	135		1695-1715	AACCAUCUAAAAUUGAU UCCCAC	244		1693-1715
AD- 133130 1.1	CAAAAUGUUGAUCCA UCCAAU	136		1421-1441	ATUGGATGGAUCAACAU UUUGGU	245		1419-1441
AD- 133130 2.1	UGGACAUUAAUUCAA CAUCGA	137		924-944	UCGATGTUGAATUAAUG UCCAUG	246		922-944
AD- 133132 8.1	AAUGUUCACAAUUA GCUCCU	114		80-100	AGGAGCTUAAUTGTGAA CAUUUU	247		78-100
AD- 133132 9.1	AUUUGCUAUGUUAGA CGAUGU	115		188-208	ACAUCGTCUAACATAGC AAAUCU	248		186-208
AD- 133133 0.1	UUGCUAUGUUAGACG AUGUAA	116		190-210	UTACAUCGUCUAACATA GCAAAU	249		188-210

AD- 133130 6.1	UGCUAUGUUAGACGA UGUAAA	117		191-211	UTUACATCGUCTAACAU GCAA	226		189-211
AD- 133133 1.1	AACUGAGAAGAACUA CAUUA	118		373-393	UAUATGTAGUUCUTCTCA GUUCC	250		371-393
AD- 133133 2.1	AACCAACAGCAUAGUC AAUA	119		648-668	UAUUTGACUAUGCTGTU GGUUA	251		646-668
AD- 133133 3.1	CCCACAGAAAUUCUC UAUCU	120		711-731	AGAUAGAGAAATUTCTG UGGGU	252		709-731
AD- 133133 4.1	CAGGUAGUCCAUGGAC AUUAA	121		913-933	UTAATGTCCAUGGACTAC CUGAU	253		911-933
AD- 133131 1.1	GGUAGUCCAUGGACA UUAUU	122		915-935	AAUUAATGUCCAUGGAC UACCUG	231		913-935
AD- 133133 5.1	AGUUGGAAGACUGGA AAGACA	123		1081-1101	UGUCTUTCCAGTCTUCCA ACUCA	254		1079-1101

AD- 133133 6.1	UGGAAAGACAACAAA CAUUAU	124		1092-1112	ATAATGTUUGUTGTCTUU CCAGU	255		1090-1112
AD- 133131 4.1	UUUACUUGGGAAAUC ACGAAA	125		1126-1146	UTUCGUGAUUUCCCAAG UAAAAA	234		1124-1146
AD- 133133 7.1	GGGAAAUCACGAAACC AACUA	126		1133-1153	UAGUTGGUUUCGUGATU UCCCAA	256		1131-1153
AD- 133131 6.1	GAAAUCACGAAACCAA CUAUA	127		1135-1155	UAUAGUTGGUUTCUGUGA UUUCCC	236		1133-1155
AD- 133133 8.1	CGAAACCAACUAUACG CUACA	128		1142-1162	UGUAGCGUAUAGUTGGU UUCGUG	257		1140-1162
AD- 133133 9.1	AUCAACCAAAAUGUU GAUCCA	129		1415-1435	UGGATCAACAUTUTGGU UGAUUU	258		1413-1435
AD- 133134 0.1	UUAAAACUCUAAACU UGACUA	130		1850-1870	UAGUCAAGUUUTGAGTU UUAACA	259		1848-1870

AD- 133132 0.1	CAAAACUUGAAAGCCU CCUAU	131		445-465	ATAGGAGGCUUTCAAGU UUUGAG	240		443-465
AD- 133134 1.1	UCAACAUCGAAUAGA UGGAUU	132		935-955	AAUCCATCUAUTCGATGU UGAAU	260		933-955
AD- 133132 2.1	CAAAACUUCAAUGAA ACGUGU	133		957-977	ACACGUTUCAUTGAAGU UUUGUG	242		955-977
AD- 133134 2.1	AAUCACGAAACCAACU AUACU	134		1137-1157	AGUATAGUUGGTUTCGU GAUUUC	261		1135-1157
AD- 133134 3.1	GGGAAUCAAUUUUAG AUGGUU	135		1695-1715	AACCAUCUAAAUTGAU UCCCAC	262		1693-1715
AD- 133132 5.1	CAAAAUGUUGAUCCA UCCA AU	136		1421-1441	ATUGGATGGAUCAACAU UUUGGU	245		1419-1441
AD- 133134 4.1	UGGACAUUAAUUCAA CAUCGA	137		924-944	UCGATGTUGAATUAATG UCCAUG	263		922-944

Таблица 3. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК против ANGPTL3

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:
AD-1331197.1	asusaaaaAfuGfUfUfcac aauuaauL96	264	asUfsuaaUfugugaacAfuUfuuuu uscsu	372	AGAUA AAAAUGUUCACAA UUAAG	503
AD-1331198.1	usasaaaaUfgUfUfCfaca aauaaguL96	265	asCfsuaaAfuugugaaCfaUfuuuu asusc	373	GAUAAAAAUGUUCACAAU UAAGC	504
AD-1331199.1	asasaaauGfuUfCfAfaa uuagcuL96	266	asGfscuuAfaugugaAfcAfuuu uusasu	374	AUAAAAAUGUUCACAAU AAGCU	505
AD-1331200.1	asasaaugUfuCfAfCfaau uaagcuL96	267	asAfsghuUfaauugugAfaCfauu ususa	375	UAAAAAUGUUCACAAUUA AGCUC	506
AD-1331201.1	asasauguUfcAfCfAfaau aagcucuL96	268	asGfsagdCu(Tgn)aauguGfaAf cauususu	376	AAAAAUGUUCACAAUUA GCUCC	507
AD-1331202.1	asusguucAfcAfAfUfua agcuccuuL96	269	asAfsaggdAg(C2p)uuuuuuGfuG faacaususu	377	AAAUGUUCACAAUUAAGC UCCUU	508
AD-1331203.1	usgsuucacfaAfUfUfaag cuccuuuL96	270	asAfsagdGa(G2p)cuuaauUfgU fgaacasusu	378	AAUGUUCACAAUUAAGCU CCUUC	509
AD-1331204.1	gsusucacAfaUfUfAfagc uccuucuL96	271	asGfsaadGg(Agn)gcuuaaUfuG fugaacsasu	379	AUGUUCACAAUUAAGCUC CUUCU	510
AD-1331205.1	ususcacaAfuUfAfAfagc uccuucuL96	272	asAfsgadAg(G2p)agcuuaAfuU fgugaascsa	380	UGUUCACAAUUAAGCUC UUCUU	511

AD-66977.2	uscsacaaUfuAfaGfcuc cuucuuuL96	273	asAfsagaAfggagcuAfaUfugug asasc	381	GUUCACAAUUAAGCUCCU UCUUU	512
AD-1331206.1	csascaauUfaAfgCfucc uucuuuuL96	274	asAfsaagAfggagcuUfaAfuugu gsasa	382	UUCACAAUUAAGCUCCUUC UUUU	513
AD-1331207.1	ascsaauUfaAfgCfUfcu ucuuuuuL96	275	asAfsaaaGfaaggagcUfuAfaauug usgsa	383	UCACAAUUAAGCUCCUUCU UUUU	514
AD-1331208.1	csasauuaAfgCfUfCfcuu cuuuuuuL96	276	asAfsaaaAfgaaggagCfuUfaauu gsusg	384	CACAAUUAAGCUCCUUCUU UUUA	515
AD-1331209.1	asasuuaGfcUfCfCfuuc uuuuuuL96	277	asUfsaaaAfaagaaggGfcUfuaau usgsu	385	ACAAUUAAGCUCCUUCUU UUUAU	516
AD-67003.3	asusuaagCfuCfCfUfucu uuuuuuL96	278	asAfsuaaAfaagaaggAfgCfuuaa ususg	386	CAAUUAAGCUCCUUCUUU UUAUU	517
AD-1331210.1	ususaagCfuCfUfUfcuu uuuuuuL96	279	asAfsauaAfaaagaagGfaGfcuaa asusu	387	AAUUAAGCUCCUUCUUUU UAUUG	518
AD-1331211.1	usasagcuCfcUfUfCfuuu uuuuuuL96	280	asCfsaaUfaaaagaaGfgAfgcuu asasu	388	AUUAAGCUCCUUCUUUUU AUUGU	519
AD-1331212.1	asasgucCfuUfCfUfuuu uuuuuuL96	25	asAfscaaUfaaaaagaAfgGfagcu usasa	22	UUAAGCUCCUUCUUUUUA UUGUU	520
AD-1331213.1	asgscuccUfuCfUfUfuu uuuuuuL96	281	asAfsacaAfuaaaaagAfaGfgagc ususa	24	UAAGCUCCUUCUUUUUAU UGUUC	521
AD-1331214.1	gscsuccUfcUfUfUfuu uuuuuuL96	282	asGfsaacAfuaaaaaGfaAfggag csusu	389	AAGCUCCUUCUUUUUAU GUUCC	522

AD-1331215.1	csusccuuCfuUfUfUfua uuguuccuL96	283	asGfsgaaCfaauaaaaAfgAfagga gscsu	390	AGCUCCUUCUUUUUAUUG UCCCU	523
AD-1331216.1	uscscuucUfuUfUfUfau uguuccuL96	284	asAfsaggAfcauuaaaAfaGfaagg asgsc	391	GCUCCUUCUUUUUAUUGU UCCUC	524
AD-1331217.1	cscsuucuUfuUfUfAfu guuccucuL96	285	asGfsaggAfacauuaaAfaAfgaag gsasg	392	CUCCUUCUUUUUAUUGUU CCUCU	525
AD-1331218.1	csusucuuUfuUfAfUfug uuccucuaL96	286	usAfsgadGg(Agn)acaauaAfaAf agaagsgsa	393	UCCUUCUUUUUAUUGUUC CUCUA	526
AD-1331220.1	uscstuuuUfaUfUfGfu ccucuaguL96	287	asCfsuadGa(G2p)gaacaaUfaAf aaagasasg	394	CUUCUUUUUAUUGUCCU CUAGU	527
AD-1331221.1	csusuuuuAfuUfGfUfuc cucuaguL96	288	asAfsudAg(Agn)ggaacaAfuA faaaagsasa	395	UUCUUUUUAUUGUCCUC UAGUU	528
AD-1331222.1	ususuuuuUfuGfUfUfcc ucuaguuuL96	289	asAfsacuAfgaggaacAfaUfaaaa asgsa	396	UCUUUUUAUUGUCCUCU AGUUA	529
AD-1331223.1	ususuuauUfgUfUfCfcu cuaguuuL96	290	asUfsaacUfagaggaaCfaAfuaaa asasg	397	CUUUUUUAUUGUCCUCUA GUUAU	530
AD-1331224.1	asusuucaAfaAfAfCfuca acauuuL96	291	asAfsuadTg(Tgn)ugaguUfuUf gaausasu	398	AUAUUUCAAAAACUCAAC AUAUU	531
AD-1331225.1	ususucuaAfaAfCfUfcaa cauuuuL96	292	asAfsaudAu(G2p)uugaguUfuU fugaaasusa	399	UAUUUCAAAAACUCAACA UAUUU	532
AD-1331226.1	ususcaaaAfaCfUfCfaac auuuuuL96	293	asAfsaauAfuguugagUfuUfuug aasasu	400	AUUUCAAAAACUCAACAU AUUUG	533

AD-1331227.1	uscsaaaaAfcUfCfAfaca uauuuguL96	294	asCfsaaaUfauguugaGfuUfuuu asasa	401	UUUCAAAAACUCAACAUA UUUGA	534
AD-1331228.1	csasaaaaCfuCfAfAfc auuugauL96	295	asUfscAAfuauguugAfgUfu ugsasa	402	UUCAAAAACUCAACAUAU UUGAU	535
AD-1331229.1	asasaaacUfCfAfCfau uuugauL96	296	asAfsucaAfauauguuGfaGfu usgsa	403	UCAAAAACUCAACAUAU UGAUC	536
AD-1331230.1	asasaacuCfaAfCfAfua uugaucuL96	297	asGfsaucAfaauauguUfgAfg ususg	404	CAAAAACUCAACAUAUU GAUCA	537
AD-1331231.1	asasacucAfaCfAfUfau ugaucuL96	298	asUfsgadTc(Agn)aaauaugU aguususu	405	AAAAACUCAACAUAUUUG AUCAG	538
AD-1331232.1	asascucaAfcAfUfAfuu gaucaguL96	299	asCfsugaUfcaauauGfuUfg ususu	406	AAAACUCAACAUAUUUGA UCAGU	539
AD-1331233.1	ascsucaaCfaUfAfUfuug aucaguL96	300	asAfsudGa(Tgn)caauaUfgU ugagususu	407	AAACUCAACAUAUUUGAU CAGUC	540
AD-1331234.1	uscsaacaUfaUfUfUfgau cagucuuL96	301	asAfsgadCu(G2p)aucaaaU guugasgsu	408	ACUCAACAUAUUUGAUC GUCUU	541
AD-67031.2	csasacauAfuUfUfGfauc agucuuL96	302	asAfsagaCfugaucAAfuAfug gsasg	409	CUCAACAUAUUUGAUCAG UCUUU	542
AD-1331235.1	asascauaUfuUfGfAfuca gucuuuuL96	303	asAfsaadGa(C2p)ugaucaA auguusgsa	410	UCAACAUAUUUGAUCAGU CUUUU	543
AD-65695.22	ascsauauUfuGfAfUfcag ucuuuuL96	304	asAfsaaaGfacugaucAfaAfu ususg	411	AAAAAGACUGAUCAAAUA UGUUG	544

AD-1331236.1	csasuauUfgAfUfCfag ucuuuuuuL96	305	asAfsaaaAfgacugauCfaAfauau gsusu	412	AACAUAUUUGAUCAGUCU UUUUA	545
AD-1331237.1	asusauuuGfaUfCfAfgu cuuuuuauL96	306	asUfsaaaAfgacugaUfcAfaaua usgsu	413	ACAUAUUUGAUCAGUCUU UUUAU	546
AD-1331238.1	usasuuugAfuCfAfGfuc uuuuuuauL96	307	asAfsuuaAfaagacugAfuCfaau asusg	414	CAUAUUUGAUCAGUCUUU UUAUG	547
AD-1331239.1	asusuugaUfcAfGfUfcu uuuuauL96	308	asCfsauaAfaagacuGfaUfcaaa usasu	415	AUAUUUGAUCAGUCUUUU UAUGA	548
AD-1331240.1	ususugauCfaGfUfCfu uuuauL96	309	asUfscAuAfaaaagacUfgAfucua asusa	416	UAUUUGAUCAGUCUUUUU AUGAU	549
AD-1331241.1	ususgaucAfgUfCfUfu uuauL96	310	asAfsucaUfaaaaagaCfuGfauca asasu	417	AUUUGAUCAGUCUUUUUA UGAUC	550
AD-1331242.1	usgsaucaGfuCfUfUfu uauL96	311	asGfsaudCa(Tgn)aaaaagAfcUf gaucasasa	418	UUUGAUCAGUCUUUUUAU GAUCU	551
AD-1331243.1	gsasucagUfcUfUfUfu auL96	312	usAfsgadTc(Agn)uaaaaGfaCf ugaucsasa	419	UUGAUCAGUCUUUUUAUG AUCUA	552
AD-1331244.1	asuscaguCfuUfUfUfua uauL96	313	asUfsagdAu(C2p)auaaaaAfgAf cugauscsa	420	UGAUCAGUCUUUUUAUGA UCUAU	553
AD-1331245.1	uscsagucUfuUfUfUfau gauL96	314	asAfsuadGa(Tgn)cauaaaAfaGf acugasusc	421	GAUCAGUCUUUUUAUGAU CUAUC	554
AD-1331246.1	csasgucuUfuUfUfAfug auL96	315	asGfsaudAg(Agn)ucauaaAfaAf gacugsasu	422	AUCAGUCUUUUUAUGAUC UAUCG	555

AD-1331247.1	asgsucuuUfuUfAfUfga ucuaucguL96	316	asCfsgauAfgaucauaAfaAfac usgsa	423	UCAGUCUUUUUAUGAUCU AUCGC	556
AD-1331248.1	gsuscuuUfuAfUfGfau cuaucgcuL96	317	asGfscgaUfagaucuAfaAfaaga csusg	424	CAGUCUUUUUAUGAUCUA UCGCU	557
AD-1331249.1	uscuuuuUfaUfGfAfuc uaucgcuL96	318	asAfsqcgAfuagaucaUfaAfaaag ascsu	425	AGUCUUUUUAUGAUCUAU CGCUG	558
AD-1331250.1	csuuuuUfuGfAfUfcu aucgcuguL96	319	asCfsagcGfauagaucAfuAfaaaa gsasc	426	GUCUUUUUAUGAUCUAUC GCUGC	559
AD-1331251.1	asascuccAfgAfAfCfacc cagaaguL96	320	asCfsuudCu(G2p)gguguuCfuG fgaguususc	427	GAAACUCCAGAACACCCAG AAGU	560
AD-1331252.1	ascsuccaGfaAfCfAfccc agaaguaL96	321	usAfsrudTc(Tgn)gguguuUfcUf ggagususu	428	AAACUCCAGAACACCCAGA AGUA	561
AD-1331253.1	csuscagAfaCfAfCfcca gaaguaaL96	322	usUfsrudTu(C2p)uggugUfuC fuggagsusu	429	AACUCCAGAACACCCAGAA GUAA	562
AD-1331254.1	uscscagaAfcAfCfCfcag aaguaauL96	323	asUfsuadCu(Tgn)cuggguGfuU fcuggagsu	430	ACUCCAGAACACCCAGAAG UAAC	563
AD-1331255.1	csesagaaCfaCfCfCfaga aguaacuL96	324	asGfsuudAc(Tgn)ucugggUfgU fucuggsasg	431	CUCCAGAACACCCAGAAGU AACU	564
AD-1331256.1	csasgaacAfcCfCfAfgaa guaacuuL96	325	asAfsrudTa(C2p)uucuggGfuG fuucuggsgsa	432	UCCAGAACACCCAGAAGUA ACUU	565
AD-1331257.1	asgsaacaCfcCfAfGfaag uaacuuuL96	326	asAfsaguUfacuucugGfgUfguuc usgsg	433	CCAGAACACCCAGAAGUAA CUUC	566

AD-1331258.1	gsasacacCfcAfGfAfagu aacuucal96	327	usGfsaadGu(Tgn)acuucuGfgGf uguucsusg	434	CAGAACACCCAGAAGUAAC UUCA	567
AD-1331259.1	asascaccCfaGfAfAfgua acuucal96	328	asUfsgadAg(Tgn)uacuucUfgGf guguuscsu	435	AGAACACCCAGAAGUAAC UUCAC	568
AD-1331260.1	ascsaccAfgAfAfGfuaa cuucacuL96	329	asGfsugdAa(G2p)uuacuuCfuG fggugususc	436	GAACACCCAGAAGUAACU UCACU	569
AD-1331261.1	csascccaGfaAfGfUfaac uucacuuL96	330	asAfsugdGa(Agn)guuacuUfcU fgggugsusu	437	AACACCCAGAAGUAACUUC ACUU	570
AD-1331262.1	ascscagAfaGfUfAfacu ucacuuuL96	331	asAfsaguGfaaguuacUfuCfuggg usgsu	438	ACACCCAGAAGUAACUUCA CUUA	571
AD-1331263.1	cscscagaAfgUfAfAfcuu cacuuaaL96	332	usUfसाadGu(G2p)aaguuaCfuU fcugggsusg	439	CACCCAGAAGUAACUUCAC UUA	572
AD-1331264.1	cscsagaaGfuAfAfCfuuc acuuaaaL96	333	usUfsuadAg(Tgn)gaaguuAfcU fucuggsgsu	440	ACCCAGAAGUAACUUCACU UAAA	573
AD-1331265.1	csasgaagUfaAfCfUfuca cuuaaaaL96	334	usUfsuudAa(G2p)ugaaguUfaC fuucugsgsg	441	CCCAGAAGUAACUUCACUU AAAA	574
AD-1331266.1	asgsaaguAfaCfUfUfcac uuaaaaL96	335	asUfsuuuAfagugaagUfuAfcuuc usgsg	442	CCAGAAGUAACUUCACUU AAAAC	575
AD-1331267.1	gsasaguaAfcUfUfCfacu uaaaacuL96	336	asGfsuuuUfaagugaaGfuUfacuu csusg	443	CAGAAGUAACUUCACUUA AAACU	576
AD-1331268.1	asasguaaCfuUfCfAfcuu aaaacuL96	337	asAfsuuUfuaagugaAfgUfuacu uscsu	444	AGAAGUAACUUCACUUA AACUU	577

AD-1331269.1	asgsuaacUfuCfAfCfuua aaacuuuL96	338	asAfsaguUfuuaagugAfaGfuuac ususc	445	GAAGUAACUUCACUUAAA ACUUU	578
AD-1331270.1	gsusaacuUfcAfCfUfuua aacuuuuL96	339	asAfsaagUfuuaaguGfaAfguua csusu	446	AAGUAACUUCACUUAAAA CUUUU	579
AD-1331271.1	usasacuuCfaCfUfUfaaa acuuuuuL96	340	asAfsaaaGfuuuuaagUfgAfaguu ascsu	447	AGUAACUUCACUUAAAAC UUUUG	580
AD-1331272.1	asascuucAfcUfUfAfaaa cuuuuguL96	341	asCfsaaaAfguuuuuaGfuGfaagu usasc	448	GUAACUUCACUUAAAACU UUUGU	581
AD-1331273.1	ascsuucaCfuUfAfAfaac uuuuguuL96	342	asAfscaaAfaguuuuaAfgUfgaag ususa	449	UAACUUCACUUAAAACUU UUGUA	582
AD-1331274.1	csusucacUfuAfAfAfacu uuuguauL96	343	asUfsacaAfaaguuuuAfaGfugaa gsusu	450	AACUUCACUUAAAACUUU UGUAG	583
AD-1331275.1	ususcacuUfaAfAfAfcu uuuguaguL96	344	asCfsuacAfaaaguuuUfaAfguga asgsu	451	ACUUCACUUAAAACUUUU GUAGA	584
AD-1331276.1	uscsacuuAfaAfAfCfu uuguagauL96	345	asUfscuaCfaaaaguuUfuAfagug asasg	452	CUUCACUUAAAACUUUUG UAGAA	585
AD-1331277.1	csascuuaAfaAfCfUfuuu guagaaaL96	346	usUfsucdTa(C2p)aaaaguUfuUf aagugsasa	453	UUCACUUAAAACUUUUGU AGAAA	586
AD-1331278.1	ascsuuaaAfaCfUfUfuug uagaaaaL96	347	usUfsuudCu(Agn)caaaagUfuU fuaagusgsa	454	UCACUUAAAACUUUUGUA GAAAA	587
AD-1331279.1	asasuguucaCfAfAfuuaa gcuccuL96	348	asdGsgadGcdTuaaudTgUfgaac auususu	455	AAAUGUUCACAAUUAAG CUCCU	588

AD-1331280.1	asusuugcuaUfGfUfuaga cgauguL96	349	asdCsaudCgdTcuaadCaUfagca aauscsu	456	AGAUUUGCUAUGUUAGAC GAUGU	589
AD-1331281.1	ususgcuaugUfUfAfgac gauguaaL96	350	usdTsacdAudCgucudAaCfauag caasasu	457	AUUUGCUAUGUUAGACGA UGUAA	590
AD-1331282.1	usgscuauguUfAfGfacga uguaaaL96	351	usdTsudCadTcgucdTaAfcuaa gcasasa	458	UUUGCUAUGUUAGACGAU GUAAA	591
AD-1331283.1	asascugagaAfGfAfacua cauauaL96	352	usdAsuadTgdTaguudCuUfcuca guuscsc	459	GGAACUGAGAAGAACUAC AUAAU	592
AD-1331284.1	asascaacaGfCfAfuagu caaauaL96	353	usdAsuudTgdAcuaudGcUfguu gguususa	460	UAAACCAACAGCAUAGUC AAAUA	593
AD-1331285.1	cscscacagaAfAfUfuucu cuaucuL96	354	asdGsaudAgdAgaadTuUfcug ugggsusu	461	AACCCACAGAAAUUUCUCU AUCU	594
AD-1331286.1	csasgguaguCfCfAfugga cauuuaL96	355	usdTsaadTgdTccaudGgAfcuac cugsasu	462	AUCAGGUAGUCCAUGGAC AUUAA	595
AD-1331287.1	gsgsuaguccAfUfGfgaca uuauuuL96	356	asdAsuudAadTgucudAuGfgac uaccsusg	463	CAGGUAGUCCAUGGACAU UAAUU	596
AD-1331288.1	asgsuuggaaGfAfCfugga aagacaL96	357	usdGsudTudTccagdTcUfucca acuscsa	464	UGAGUUGGAAGACUGGAA AGACA	597
AD-1331289.1	usgsgaaagaCfAfAfcaaa cauuauL96	358	asdTsaadTgdTuugudTgUfcuuu ccasgsu	465	ACUGGAAAGACAACAAC AUAAU	598
AD-1331290.1	ususuacuugGfGfAfauc acgaaaL96	359	usdTsuudGudGauuudCcCfaag uaasasa	466	UUUUUACUUGGGAAAUCA CGAAA	599

AD-1331291.1	gsgsgaaucAfCfGfaaac caacuaL96	360	usdAsgudTgdGuuucdGuGfauu ucccsasa	467	UUGGGAAAUCACGAAACC AACUA	600
AD-1331292.1	gsasaucacGfAfAfacca acuauaL96	361	usdAsuadGudTgguudTcGfuga uuucscsc	468	GGGAAAUCACGAAACCAA CUAUA	601
AD-1331293.1	csgsaaaccaAfCfUfauac gcuacaL96	362	usdGsuadGcdGuauadGuUfggu uucgsusg	469	CACGAAACCAACUAUACGC UACA	602
AD-1331294.1	asuscaaccaAfAfAfuguu gauccaL96	363	usdGsgadTcdAacaudTuUfggu ugaususu	470	AAAUCAACCAAAAUGUUG AUCCA	603
AD-1331295.1	ususaaaacuCfUfAfaacu ugacuaL96	364	usdAsgudCadAguuudTgAfguu uuaascsa	471	UGUUAAAACUCUAAACUU GACUA	604
AD-1331296.1	csasaaacuuGfAfAfagcc uccuauL96	365	asdTsagdGadGgcuudTcAfaguu uugsasg	472	CUCAAAACUUGAAAGCCUC CUAG	605
AD-1331297.1	uscsaacaucGfAfAfuaaga uggauuL96	366	asdAsucdCadTcuauadTcGfauu ugasasu	473	AUUCAACAUCGAAUAGAU GGAUC	606
AD-1331298.1	csasaaacuuCfAfAfugaa acguguL96	367	asdCsacdGudTucaudTgAfaguu uugsusg	474	CACAAAACUCAAUGAAA CGUGG	607
AD-1331299.1	asasucacgaAfAfCfcaac uauacuL96	368	asdGsuadTadGuuggdTuUfcgu gauususc	475	GAAAUACACGAAACCAACU AUACG	608
AD-1331300.1	gsgsgaaucaAfUfUfuuag augguuL96	369	asdAsccdAudCuaaadAuUfgau ucccsasc	476	GUGGGAAUCAAUUUUAGA UGGUC	609
AD-1331301.1	csasaaauguUfGfAfucca uccaauL96	370	asdTsugdGadTggaudCaAfcauu uugsgsu	477	ACCAAAAUGUUGAUCCA CCAAC	610

AD-1331302.1	usgsgacauuAfAfUfucaa caucgaL96	371	usdCsgadTgdTugaadTuAfaugu ccasusg	478	CAUGGACAUUAUUUCAAC AUCGA	611
AD-1331328.1	asasuguucaCfAfAfuuaa gcuccuL96	348	asdGsgadGcdTuaaudTgdTgdA acauususu	479	AAA AUGUUCACAAUUAAG CUCCU	588
AD-1331329.1	asusuugcuaUfGfUfuaga cgauguL96	349	asdCsaudCgdTcuaadCadTadG caaausesu	480	AGAUUUGCUAUGUUAGAC GAUGU	589
AD-1331330.1	ususgcuaugUfUfAfgac gauguaaL96	350	usdTsacdAudCgucudAadCadT agcaasasu	481	AUUUGCUAUGUUAGACGA UGUAA	590
AD-1331306.1	usgscuauguUfAfGfacga uguaaaL96	351	usdTsuaadCadTcgucdTadAcda uagcasasa	482	UUUGCUAUGUUAGACGAU GUAAA	591
AD-1331331.1	asascugagaAfGfAfacua cauauaL96	352	usdAsuaadTgdTaguudCudTcdT caguuscsc	483	GGAACUGAGAAGAACUAC AUUAU	592
AD-1331332.1	asascaacaGfCfAfuagu caaauaL96	353	usdAsuudTgdAcuaudGcdTgdT ugguususa	484	UAAACCAACAGCAUAGUC AAAUA	593
AD-1331333.1	cscscacagaAfAfUfuucu cuaucuL96	354	asdGsaudAgdAgaadTudTcdT gugggsusu	485	AACCCACAGAAAUUUCUCU AUCU	594
AD-1331334.1	csasgguaguCfCfAfugga cauuuaL96	355	usdTsaadTgdTccaudGgdAcdT accugsasu	486	AUCAGGUAGUCCAUGGAC AUUAA	595
AD-1331311.1	gsgsuaguccAfUfGfgaca uuuuuuL96	356	asdAsuudAadTgucudAudGgd Acuaccusg	487	CAGGUAGUCCAUGGACAU UAAUU	596
AD-1331335.1	asgsuuggaaGfAfCfugga aagacaL96	357	usdGsucdTudTccagdTcdTudC caacuscsa	488	UGAGUUGGAAGACUGGAA AGACA	597

AD-1331336.1	usgsgaaagaCfAfAfcaaa cauuauL96	358	asdTsaadTgdTuugudTgdTcdT uuccasgsu	489	ACUGGAAAGACAACAAAC AUUAU	598
AD-1331314.1	ususuaacuugGfGfAfauc acgaaaL96	359	usdTsuCdGudGauuudCcdCadA guaaasasa	490	UUUUUACUUGGGAAAUCA CGAAA	599
AD-1331337.1	gsgsgaaucAfCfGfaaac caacuaL96	360	usdAsgudTgdGuuucdGudGad Tuuccsasa	491	UUGGGAAAUCACGAAACC AACUA	600
AD-1331316.1	gsasaucacGfAfAfacca acuauaL96	361	usdAsuadGudTgguudTcdGud Gauuucscsc	492	GGGAAAUCACGAAACCAA CUAUA	601
AD-1331338.1	csgsaaaccaAfCfUfauac gcuacaL96	362	usdGsuaDGcdGuauadGudTgd Guuucgsusg	493	CACGAAACCAACUAUACGC UACA	602
AD-1331339.1	asuscaaccaAfAfAfuguu gauccaL96	363	usdGsgadTcdAacaudTudTgdG uugaususu	494	AAAUCAACCAAAAUGUUG AUCCA	603
AD-1331340.1	ususaaaacuCfUfAfaacu ugacuaL96	364	usdAsgudCadAguuudTgdAgd Tuuaaascsa	495	UGUUAAAACUCUAAACUU GACUA	604
AD-1331320.1	csasaacuuGfAfAfagcc uccuauL96	365	asdTsagdGadGgcuudTcdAadG uuuugsasg	496	CUCAAAACUUGAAAGCCUC CUAG	605
AD-1331341.1	uscsaacuacGfAfAfuaga uggauuL96	366	asdAsuCdCadTcuauTcdGadT guugasasu	497	AUUCAACAUCGAAUAGAU GGAUC	606
AD-1331322.1	csasaacuuCfAfAfugaa acguguL96	367	asdCsacdGudTucaudTgdAadG uuuugsusg	498	CACAAAACUUCAAUGAAA CGUGG	607
AD-1331342.1	asasucacgaAfAfCfcaac uauacuL96	368	asdGsuaDTadGuuggdTudTcdG ugauususc	499	GAAUUCACGAAACCAACU AUACG	608

AD-1331343.1	gsgsgaaucaAfUfUfuuag augguuL96	369	asdAsccdAudCuaaadAudTgdA uucccsasc	500	GUGGGAAUCAAUUUUAGA UGGUC	609
AD-1331325.1	csasaauguUfGfAfucca uccaauL96	370	asdTsugdGadTggaudCadAcdA uuuugsgsu	501	ACCAAAAUGUUGAUCCA CCAAC	610
AD-1331344.1	usgsgacauuAfAfUfucaa caucgaL96	371	usdCsgadTgdTugaadTudAadT guccasusg	502	CAUGGACAUAUUUCAAC AUCGA	611

Таблица 4. Скрининг дозы для ANGPTL3 в первичных гепатоцитах яванской макаки (PCH)

Идентификатор дуплекса	10 нМ		1 нМ		0,1 нМ	
	Средний % оставшейся мРНК яванской макаки	STDEV	Средний % оставшейся мРНК яванской макаки	STDEV	Средний % оставшейся мРНК яванской макаки	STDEV
AD-1331197.1	17,2	4,9	17,2	3,1	42,1	16,6
AD-1331198.1	18,7	3,3	15,6	9,8	117,6	10,7
AD-1331199.1	22,5	3,2	20,6	1,2	79,0	20,6
AD-1331200.1	16,0	2,3	10,7	6,4	47,0	14,5
AD-1331201.1	33,2	1,5	22,1	13,9	95,6	3,0
AD-1331202.1	15,4	5,8	12,2	1,2	34,2	11,8
AD-1331203.1	14,2	1,6	10,3	3,7	32,6	5,9
AD-1331204.1	21,4	1,5	15,2	0,9	73,1	4,2
AD-1331205.1	21,7	5,5	15,6	0,2	40,1	11,3
AD-66977.2	19,3	2,6	17,4	2,6	39,2	4,8
AD-1331206.1	16,0	9,0	11,2	1,1	18,6	4,9
AD-1331207.1	17,9	6,0	10,2	3,2	24,2	8,9
AD-1331208.1	19,4	4,5	11,8	0,9	29,1	12,6
AD-1331209.1	10,9	2,8	11,9	2,9	27,6	3,9
AD-67003.3	13,7	3,3	11,8	1,3	27,0	5,0
AD-1331210.1	23,2	5,8	24,6	1,8	58,4	15,3
AD-1331211.1	25,9	8,3	22,5	0,3	68,1	11,4
AD-1331212.1	13,0	5,2	12,5	0,8	33,4	10,7
AD-1331213.1	23,1	9,0	8,5	0,5	22,1	3,1
AD-1331214.1	25,9	13,0	27,5	6,1	69,5	13,3
AD-1331215.1	16,6	4,3	18,2	3,7	53,0	9,2
AD-1331216.1	18,3	4,1	17,8	4,0	44,0	6,5
AD-1331217.1	27,5	8,6	29,8	5,2	81,8	21,5
AD-1331218.1	21,2	2,2	26,7	6,2	63,5	9,7
AD-1331220.1	36,0	7,5	26,5	4,0	59,7	6,7
AD-1331221.1	34,7	0,3	55,1	5,0	89,3	12,3

AD-1331222.1	17,4	2,6	17,3	4,2	43,6	12,2
AD-1331223.1	13,6	1,5	16,0	2,8	39,7	10,0
AD-1331224.1	23,3	4,0	28,5	5,4	60,3	15,5
AD-1331225.1	20,3	7,8	18,8	1,4	50,5	9,5
AD-1331226.1	14,6	3,0	13,3	4,7	46,2	11,3
AD-1331227.1	23,7	11,6	26,2	6,6	65,2	6,1
AD-1331228.1	14,8	1,9	10,3	0,7	25,9	2,4
AD-1331229.1	16,6	5,2	13,0	1,8	38,6	17,3
AD-1331230.1	14,3	4,1	13,2	1,9	44,4	12,4
AD-1331231.1	27,2	6,0	29,9	6,4	68,0	13,1
AD-1331232.1	32,7	7,9	64,6	4,1	110,0	6,3
AD-1331233.1	26,5	4,1	23,9	1,2	70,0	16,6
AD-1331234.1	15,4	3,2	11,8	3,3	37,2	13,6
AD-67031.2	12,3	1,3	9,6	3,3	31,4	5,3
AD-1331235.1	19,7	12,5	10,2	0,5	21,3	6,7
AD-65695.22	23,2	13,7	9,3	0,3	16,9	3,4
AD-1331236.1	26,1	15,3	21,7	3,1	51,8	3,1
AD-1331237.1	10,9	3,2	11,8	1,9	26,2	6,2
AD-1331238.1	48,2	21,0	13,1	0,8	18,3	4,3
AD-1331239.1	26,4	8,5	38,7	26,4	88,0	4,2
AD-1331240.1	12,6	3,6	8,3	0,5	26,6	2,9
AD-1331241.1	18,4	5,1	13,2	0,7	37,5	5,7
AD-1331242.1	82,5	18,7	77,3	5,4	87,9	5,6
AD-1331243.1	48,8	6,0	48,6	9,9	86,4	3,3
AD-1331244.1	9,6	1,2	9,5	1,0	23,2	4,2
AD-1331245.1	16,5	3,8	25,5	1,1	70,2	9,9
AD-1331246.1	24,7	10,8	25,1	2,9	68,7	9,7
AD-1331247.1	23,2	3,1	43,3	3,9	84,2	1,5
AD-1331248.1	42,1	4,4	65,4	5,8	90,0	5,2
AD-1331249.1	17,5	4,6	19,7	4,0	44,9	6,0
AD-1331250.1	20,1	4,3	35,1	2,1	70,0	8,0
AD-1331251.1	27,7	2,8	48,0	3,7	72,7	5,0
AD-1331252.1	14,1	2,7	17,2	1,1	45,6	6,2
AD-1331253.1	13,8	2,1	19,8	6,9	71,7	11,1

AD-1331254.1	39,4	4,8	61,7	6,8	87,1	7,7
AD-1331255.1	10,5	2,5	12,3	2,2	53,7	4,9
AD-1331256.1	10,1	4,1	7,9	1,6	19,0	5,3
AD-1331257.1	11,8	2,0	12,3	1,0	30,7	6,8
AD-1331258.1	34,1	3,7	52,2	7,0	74,3	7,6
AD-1331259.1	9,8	0,8	11,8	3,1	28,9	3,2
AD-1331260.1	12,3	1,5	15,2	2,3	47,9	8,8
AD-1331261.1	7,2	0,4	13,0	0,6	54,6	5,6
AD-1331262.1	9,3	5,8	9,1	1,4	22,3	0,8
AD-1331263.1	8,2	2,2	8,2	0,9	28,4	3,3
AD-1331264.1	7,9	1,6	7,4	1,2	15,4	4,4
AD-1331265.1	10,4	3,0	8,0	1,1	18,4	7,3
AD-1331266.1	11,4	6,2	9,7	0,5	21,0	10,2
AD-1331267.1	21,0	6,6	28,6	7,1	94,6	15,5
AD-1331268.1	20,1	6,0	32,5	3,3	96,7	12,2
AD-1331269.1	9,8	1,6	10,2	1,5	34,0	13,0
AD-1331270.1	10,0	1,4	18,3	4,2	47,6	6,0
AD-1331271.1	22,1	3,8	26,2	3,3	72,0	13,6
AD-1331272.1	72,2	21,7	93,0	10,8	77,7	12,6
AD-1331273.1	20,2	4,7	44,8	3,2	75,7	14,3
AD-1331274.1	18,1	5,0	42,6	9,2	75,5	17,7
AD-1331275.1	99,2	9,6	113,2	15,1	123,9	20,7
AD-1331276.1	69,0	8,5	110,6	19,8	118,4	13,9
AD-1331277.1	50,8	3,5	82,7	16,1	125,9	14,9
AD-1331278.1	98,0	19,7	109,0	6,2	106,9	13,3
AD-1331279.1	7,8	2,0	6,6	0,7	16,1	2,5
AD-1331280.1	6,7	3,3	9,0	1,5	30,0	6,2
AD-1331281.1	10,5	0,8	16,9	4,9	54,5	12,8
AD-1331282.1	9,2	1,6	20,6	8,1	34,1	10,3
AD-1331283.1	7,1	2,4	10,5	Н/П	41,3	13,7
AD-1331284.1	13,0	3,2	10,9	Н/П	28,2	8,3
AD-1331285.1	9,1	1,8	22,5	1,6	42,9	13,8
AD-1331286.1	7,9	0,6	15,6	3,9	25,3	9,0
AD-1331287.1	54,2	6,7	74,6	12,2	112,7	19,8

AD-1331288.1	13,0	3,6	22,6	2,8	56,2	10,4
AD-1331289.1	10,1	1,8	12,3	3,4	26,7	8,8
AD-1331290.1	33,2	4,8	68,6	10,9	118,9	21,4
AD-1331291.1	10,0	0,9	26,6	18,1	64,9	20,3
AD-1331292.1	10,1	2,6	14,1	2,9	23,7	2,7
AD-1331293.1	8,5	2,3	11,2	3,8	19,5	5,8
AD-1331294.1	11,6	2,1	15,9	3,7	27,5	6,3
AD-1331295.1	110,5	23,3	80,1	7,6	85,5	4,1
AD-1331296.1	15,4	3,0	18,6	5,6	29,2	5,3
AD-1331297.1	14,2	4,2	21,1	1,4	45,5	15,2
AD-1331298.1	13,1	1,3	24,8	5,7	79,2	26,9
AD-1331299.1	7,0	2,1	19,6	13,3	34,9	6,3
AD-1331300.1	127,0	19,3	113,5	14,8	112,9	15,2
AD-1331301.1	10,0	2,9	12,6	3,6	19,7	3,3
AD-1331302.1	8,8	1,0	14,1	3,0	33,2	12,3
AD-1331328.1	9,6	2,0	19,8	4,6	23,0	1,9
AD-1331329.1	9,7	1,8	16,3	1,1	28,4	8,6
AD-1331330.1	26,3	4,3	58,4	12,1	109,3	9,6
AD-1331306.1	11,5	1,6	19,3	8,2	39,7	6,5
AD-1331331.1	9,9	1,9	11,1	2,8	20,6	5,4
AD-1331332.1	13,1	2,3	22,4	2,0	15,6	2,7
AD-1331333.1	9,0	1,0	19,0	5,8	34,3	4,1
AD-1331334.1	7,8	1,3	10,5	1,0	17,5	3,9
AD-1331311.1	67,9	13,4	89,8	11,0	94,8	6,0
AD-1331335.1	9,6	1,6	27,4	6,8	52,8	13,5
AD-1331336.1	7,1	2,1	13,5	4,5	29,8	7,1
AD-1331314.1	56,4	6,5	64,3	5,5	90,2	15,7
AD-1331337.1	7,6	1,9	20,9	3,2	48,2	3,6
AD-1331316.1	5,8	0,8	12,4	1,7	22,4	3,5
AD-1331338.1	5,1	1,5	10,3	2,4	20,6	5,8
AD-1331339.1	7,6	1,6	13,9	3,2	36,3	6,2
AD-1331340.1	119,3	11,9	113,7	8,5	105,6	8,0
AD-1331320.1	7,5	0,5	17,5	4,2	37,1	6,7
AD-1331341.1	12,2	2,3	44,4	5,4	68,3	7,2

AD-1331322.1	7,6	1,8	15,0	4,8	48,7	18,1
AD-1331342.1	4,8	1,4	15,3	6,8	26,4	6,4
AD-1331343.1	89,2	4,2	103,3	7,2	92,8	5,6
AD-1331325.1	7,4	3,1	12,2	2,3	28,3	10,3
AD-1331344.1	9,0	2,4	23,2	9,0	33,0	4,0

Пример 3. Скрининг дуплексов дцРНК у мышей *in vivo*

Дуплексы, представляющие интерес, идентифицированные в упомянутых выше исследованиях *in vitro*, оценивали *in vivo*. В частности, на день -14 перед введением дозы мышей дикого типа (C57BL/6) трансдуцировали путем внутривенного введения 2×10^{11} вирусных частиц вектора на основе аденоассоциированного вируса 8 (AAB8), кодирующего ANGPTL3 человека. В частности, мышам вводили AAB8, кодирующий открытую рамку считывания и 3'-НТО мРНК ANGPTL3 человека, которая упоминалась как NM_014495.3.

В день 0 группам из трех мышей подкожно вводили однократную дозу 3 мг/кг представляющих интерес агентов (см. Таблицу 5) или контрольный ФСБ. На день 7 или день 14 после введения дозы собирали образцы сыворотки крови и измеряли уровень ANGPTL3 в образцах сыворотки крови с помощью ИФА. Результаты показаны с групповыми средними значениями и стандартным отклонением (СО) (**Фигура 1А**) и отдельными точками, представленными на графике с СО (**Фигура 1В**). Обработка положительным контролем, AD-74757, при 3 мг/кг приводила к 3 нг/мл или ниже на День 7 и День 14, как и ожидалось. Кластер из нескольких соединений приводил к уровням ANGPTL3, сходным с эталонной группой или ниже (пунктирная линия). В частности, большинство соединений, нацеленных на область нуклеотидов 80-114 в транскрипте ANGPTL3 человека, например, AD-1331203.1, AD-1331206.1, AD-1331209.1, AD-1331212.1 и AD-1331213.1, показали KD, сходную с таковой AD-74757.

На день 14 после введения дозы животных умерщвляли, собирали образцы печени и быстро замораживали в жидком азоте. Тканевую мРНК экстрагировали и анализировали с помощью способа ОТ-кПЦР. Уровни мРНК ANGPTL3 человека сравнивали с геном домашнего хозяйства GAPDH. Затем значения нормировали к среднему значению для контрольной группы, получавшей носитель ФСБ. Данные выражали как процент от исходного значения и представляли в виде среднего значения плюс стандартное отклонение. Результаты, показанные на **Фигуре 2**, демонстрируют, что примерные протестированные дуплексные агенты эффективно снижают уровень матричной РНК ANGPTL3 человека *in vivo*.

Таблица 5. Дуплексы, представляющие интерес для скрининга *in vivo*

Название дуплекса	Диапазон
AD-1331203.1	80-102
AD-1331206.1	84-106
AD-1331209.1	87-109
AD-1331212.1	91-113
AD-1331213.1	92-114
AD-1331329.1	186-208
AD-1331237.1	307-329
AD-1331238.1	308-330
AD-1331240.1	310-332
AD-1331244.1	314-336
AD-1331256.1	545-567
AD-1331262.1	551-573
AD-1331264.1	553-575
AD-1331265.1	554-576
AD-1331266.1	555-577
AD-1331316.1	1133-1155
AD-1331338.1	1140-1162
AD-74757	553-575

Пример 4. Анализы зависимости активности от структуры (SAR)

На основании анализов *in vitro* и *in vivo* в Примерах 2 и 3 выполняли анализы зависимости активности от структуры (SAR) на отобранных дуплексах (см. Таблицу 6). В частности, дополнительные дуплексы конструировали, синтезировали и анализировали *in vitro* и *in vivo*.

киРНК синтезировали и ренатурировали с применением рутинных способов, известных в данной области техники и описанных выше. Скрининговые анализы *in vitro* в клетках РСН и клетках НерЗВ с указанными киРНК выполняли, как описано выше.

Подробные перечни немодифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи ANGPTL3 показаны в Таблице 7. Подробные перечни модифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи ANGPTL3 показаны в Таблице 8.

Результаты скрининга однократной дозы агентов на основе дцРНК, перечисленных в Таблицах 7-8, в первичных гепатоцитах яванской макаки (РСН), показаны в Таблице 9.

Результаты скрининга однократной дозы агентов на основе дцРНК, перечисленных в Таблицах 7-8, в клетках НерЗВ, показаны в Таблице 10.

Таблица 6. Дуплексы, представляющие интерес для анализа SAR

Название дуплекса	Диапазон
AD-1331203.1	80-102
AD-1331206.1	84-106
AD-1331209.1	87-109
AD-1331212.1	91-113
AD-1331213.1	92-114
AD-1331329.1	186-208
AD-1331240.1	310-332
AD-1331262.1	551-573
AD-1331264.1	553-575
AD-1331265.1	554-576
AD-1331266.1	555-577

Таблица 7. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК против ANGPTL3

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_014495.3	Антисмысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_014495.3
AD-1331203.3	UGUUCACAAUUAAGCUCCU UU	35	82-102	AAAGGAGCUUA AUUGUGAACAU U	144	80-102
AD-1331206.3	CACAAUUAAGCUCCUUCU UU	39	86-106	AAAAGAAGGAG CUAAUUGUGA A	148	84-106
AD-1331209.3	AAUUAAGCUCCUUCUUUU AU	42	89-109	AUAAAAAGAAG GAGCUUAAUUG U	151	87-109
AD-1331212.3	AAGCUCCUUCUUUUUAUUG UU	46	93-113	AACAAUAAAA GAAGGAGCUUA A	155	91-113
AD-1331213.3	AGCUCCUUCUUUUUAUUGU UU	47	61-81	AAACAAUAAAA AGAAGGAGCUU A	156	59-81
AD-1331240.3	UUUGAUCAGUCUUUUUAUG AU	75	312-332	AUCAUAAAAAG ACUGAUCAAAUA	184	310-332

AD-1331262.3	ACCCAGAAGUAACUUCACU UU	97	520-540	AAAGUGAAGUU ACUUCUGGGUGU	206	518-540
AD-1331264.3	CCAGAAGUAACUUCACUUA AA	99	555-575	UUUAAGTGAAGU UACUUCUGGGU	208	553-575
AD-1331265.3	CAGAAGUAACUUCACUAAA AA	100	556-576	UUUUAAGUGAA GUUACUUCUGGG	209	554-576
AD-1331266.3	AGAAGUAACUUCACUAAAA AU	101	557-577	AUUUUAAGUGA AGUUACUUCUGG	210	555-577
AD-1331329.3	AUUUGCUAUGUUAGACGAU GU	115	155-175	ACAUCGTCUAAC ATAGCAAUCU	248	153-175
AD-1479370.1	AAGCUCCUUCUUUUUAUUG UU	46	60-80	AACAAUAAAAA GAAGGAGCUUA A	155	58-80
AD-1479371.1	AAGCUCCUUCUUUUUAUUG UU	46	60-80	AACAAUAAAAA GAAGGAGCUUA A	155	58-80
AD-1479372.1	AAGCUCCUUCUUUUUAUUG UU	46	60-80	AACAAUAAAAA GAAGGAGCUUG G	661	58-80
AD-1479373.1	AAGCUCCUUCUUUUUAUUG UU	46	60-80	AACAAUAAAAA GAAGGAGCUUG G	661	58-80

AD-1479374.1	AAGCUCCUUCUUUUUAUUG UA	612	60-80	UACAAUAAAAA GAAGGAGCUUG G	662	58-80
AD-1479375.1	AAGCUCCUUCUUUUUAUUG UA	612	60-80	UACAAUAAAAA GAAGGAGCUUG G	662	58-80
AD-1479376.1	AAGCUCCUUCUUUUUAUUG UU	46	60-80	AACAAUAAAAA GAAGGAGCUUCU	663	58-80
AD-1479377.1	AAGCUCCUUCUUUUUAUUG UU	46	60-80	AACAAUAAAAA GAAGGAGCUUCU	663	58-80
AD-1479378.1	GCUCCUUCUUUUUAUUGUU	613	62-80	AACAAUAAAAA GAAGGAGCUU	664	60-80
AD-1479379.1	GCUCCUUCUUUUUAUUGUU	613	62-80	AACAAUAAAAA GAAGGAGCUU	664	60-80
AD-1479380.1	AAGCACCUUCUUUUUAUUG UU	614	60-80	AACAAUAAAAA GAAGGUGCUUCU	665	58-80
AD-1479381.1	AAGGUCCUUCUUUUUAUUG UU	615	60-80	AACAAUAAAAA GAAGGACCUUCU	666	58-80
AD-1479382.1	AACCUCCUUCUUUUUAUUG UU	616	60-80	AACAAUAAAAA GAAGGAGGUUC U	667	58-80
AD-1479383.1	AGCUCCUUCUUUUUAUUGU UU	47	61-81	AAACAATAAAAA GAAGGAGCUUA	668	59-81

AD-1479384.1	AGCUCCUUCUUUUUAUUGU UU	47	61-81	AAACAATAAAAA GAAGGAGCUUA	668	59-81
AD-1479385.1	AGCUCCUUCUUUUUAUUGU UU	47	61-81	AAACAATAAAAA GAAGGAGCUUG	669	59-81
AD-1479386.1	AGCUCCUUCUUUUUAUUGU UU	47	61-81	AAACAATAAAAA GAAGGAGCUUG	669	59-81
AD-1479387.1	AGCUCCUUCUUUUUAUUGU UA	617	61-81	UAACAATAAAAA GAAGGAGCUUG	670	59-81
AD-1479388.1	AGCUCCUUCUUUUUAUUGU UA	617	61-81	UAACAATAAAAA GAAGGAGCUUG	670	59-81
AD-1479389.1	AGCUCCUUCUUUUUAUUGU UU	47	61-81	AAACAATAAAAA GAAGGAGCUCU	671	59-81
AD-1479390.1	AGCUCCUUCUUUUUAUUGU UU	47	61-81	AAACAATAAAAA GAAGGAGCUCU	671	59-81
AD-1479391.1	CUCCUUCUUUUUAUUGUUU	618	63-81	AAACAATAAAAA GAAGGAGCU	672	61-81
AD-1479392.1	CUCCUUCUUUUUAUUGUUU	618	63-81	AAACAATAAAAA GAAGGAGCU	672	61-81
AD-1479393.1	AGCUGCUUCUUUUUAUUGU UU	619	61-81	AAACAATAAAAA GAAGCAGCUCU	673	59-81
AD-1479394.1	AGCACCUUCUUUUUAUUGU UU	620	61-81	AAACAATAAAAA GAAGGUGCUCU	674	59-81

AD-1479395.1	AGGUCCUUCUUUUUAUUGU UU	621	61-81	AAACAATAAAAA GAAGGUCCUCU	675	59-81
AD-1479396.1	CCAGAAGUAACUUCACUUA AA	99	522-542	UUUAAGTGAAGU UACUUCUGGGU	208	520-542
AD-1479397.1	CCAGAAGUAACUUCACUUA AA	99	522-542	UTUAAGTGAAGU UACUUCUGGGU	676	520-542
AD-1479398.1	CCAGAAGUAACUUCACUUA AA	99	522-542	UUUAAGTGAAGT UACUUCUGGGU	677	520-542
AD-1479399.1	CCAGAAGUAACUUCACUUA AA	99	522-542	UUUAAGTGAAGT UACTUCUGGGU	678	520-542
AD-1479400.1	CCAGAAGUAACUUCACUUA AA	99	522-542	UTUAAGTGAAGU UACUUCUGGCU	679	520-542
AD-1479401.1	CCAGAAGUAACUUCACUUA AA	99	522-542	UUUAAGTGAAGT UACUUCUGGCU	680	520-542
AD-1479402.1	AGAAGUAACUUCACUUAAA	622	524-542	UTUAAGTGAAGU UACUUCUGG	681	522-542
AD-1479403.1	AGAAGUAACUUCACUUAAA	622	524-542	UUUAAGTGAAGT UACUUCUGG	682	522-542
AD-1479404.1	CCAGAAGUAACUUCACUUA AA	99	522-542	UTUAAGTGAAGT UACUUCUGGGU	683	520-542
AD-1479405.1	AGAAGUAACUUCACUUAAA	622	524-542	UTUAAGTGAAGT UACUUCUGG	684	522-542

AD-1479406.1	CCAGAAGUAACUUCACUUA AA	99	522-542	UUUAAGTGAAGU UACUUCUGGGU	208	520-542
AD-1479407.1	CCAGAAGUAACUUCACUUA AA	99	522-542	UUUAAGTGAAGU UACUUCUGGGU	208	520-542
AD-1479408.1	CCAGAAGUAACUUCACUUA AA	99	522-542	UTUAAGTGAAGT UACUUCUGGGU	683	520-542
AD-1479409.1	CCAGAAGUAACUUCACUUA AA	99	522-542	UTUAAGTGAAGT UACUUCUGGGU	683	520-542
AD-1479410.1	CCAGAAGUAACUUCACUUA AA	99	522-542	UTUAAGUGAAGT UACUUCUGGCU	685	520-542
AD-1479411.1	CCAGAAGUAACUUCACUUA AA	99	522-542	UTUAAGUGAAGT UACUUCUGGCU	685	520-542
AD-1479412.1	CCAGUAGUAACUUCACUUA AA	623	522-542	UUUAAGTGAAGU UACUACUGGGU	686	520-542
AD-1479413.1	CCACAAGUAACUUCACUUA AA	624	522-542	UUUAAGTGAAGU UACUUGUGGGU	687	520-542
AD-1479414.1	CCUGAAGUAACUUCACUUA AA	625	522-542	UUUAAGTGAAGU UACUUCAGGGU	688	520-542
AD-1479415.1	UGUUCACAAUUAAGCUCCU UU	35	82-102	AAAGGAGCUUA AUUGUGAACAU U	144	80-102

AD-1479416.1	UGUUCACAAUUAAGCUCCU UU	35	49-69	AAAGGAGCUUA AUUGUGAACAU U	144	47-69
AD-1479417.1	UGUUCACAAUUAAGCUCCU UU	35	49-69	AAAGGAGCUUA AUUGUGAACAU U	144	47-69
AD-1479418.1	UGUUCACAAUUAAGCUCCU UU	35	49-69	AAAGGAGCUUA AUTGTGAACAUU	689	47-69
AD-1479419.1	UGUUCACAAUUAAGCUCCU UU	35	49-69	AAAGGAGCUUA AUTGTGAACACU	690	47-69
AD-1479420.1	UGUUCACAAUUAAGCUCCU UU	35	82-102	AAAGGAGCUUA AUUGUGAACAG G	691	80-102
AD-1479421.1	UGUUCACAAUUAAGCUCCU UU	35	82-102	AAAGGAGCUUA AUUGUGAACAG G	691	80-102
AD-1479422.1	UGUUCACAAUUAAGCUCCU UU	35	49-69	AAAGGAGCUUA AUUGUGAACAG G	691	47-69
AD-1479423.1	UGUUCACAAUUAAGCUCCU UU	35	82-102	AAAGGAGCUUA AUUGUGAACG	692	82-102
AD-1479424.1	UGUUCACAAUUAAGCUCCU UU	35	82-102	AAAGGAGCUUA AUUGUGAACG	692	82-102

AD-1479425.1	UGUUCACAAUUAAGCUCCU UU	35	49-69	AAAGGAGCUUA AUUGUGAACG	692	49-69
AD-1479426.1	UGUUGACAAUUAAGCUCCU UU	626	49-69	AAAGGAGCUUA AUUGUCAACAUI	693	47-69
AD-1479427.1	UGUACACAAUUAAGCUCCU UU	627	49-69	AAAGGAGCUUA AUUGUGUACAU U	694	47-69
AD-1479428.1	UGAUCACAAUUAAGCUCCU UU	628	49-69	AAAGGAGCUUA AUUGUGAUCAU U	695	47-69
AD-1479429.1	CACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	39	53-73	AAAAGAAGGAG CUUAAUUGUGA A	148	51-73
AD-1479430.1	CACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	39	53-73	AAAAGAAGGAG CUTAAUUGUGAA	696	51-73
AD-1479431.1	CACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	39	53-73	AAAAGAAGGAG CUUAAUUGUGG G	697	51-73
AD-1479432.1	CACAAUUAAGCUCCUUCUU UA	629	53-73	UAAAGAAGGAG CUUAAUUGUGG G	698	51-73
AD-1479433.1	CACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	39	53-73	AAAAGAAGGAG CUTAAUUGUGGG	699	51-73

AD-1479434.1	CACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	39	53-73	AAAAGAAGGAG CUUAAUUGUGCU	700	51-73
AD-1479435.1	CACAAUUAAGCUCCUUCUU UA	629	53-73	UAAAGAAGGAG CUUAAUUGUGCU	701	51-73
AD-1479436.1	CACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	39	53-73	AAAAGAAGGAG CUTAAUUGUGCU	702	51-73
AD-1479437.1	CAAUUAAGCUCCUUCUUUU	630	55-73	AAAAGAAGGAG CUUAAUUGUG	703	53-73
AD-1479438.1	CAAUUAAGCUCCUUCUUUU	630	55-73	AAAAGAAGGAG CUTAAUUGUG	704	53-73
AD-1479439.1	CACAUUUAAGCUCCUUCUU UU	631	53-73	AAAAGAAGGAG CUUAAAUGUGCU	705	51-73
AD-1479440.1	CACUAUUAAGCUCCUUCUU UU	632	53-73	AAAAGAAGGAG CUUAAUAGUGCU	706	51-73
AD-1479441.1	CAGAAUUAAGCUCCUUCUU UU	633	53-73	AAAAGAAGGAG CUUAAUUCUGCU	707	51-73
AD-1479442.1	CACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	39	53-73	AAAAGAAGGAG CUUAAUUGUGCU	700	51-73
AD-1479443.1	CACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	39	53-73	AAAAGAAGGAG CUUAAUUGUGCU	700	51-73
AD-1479444.1	CACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	39	53-73	AAAAGAAGGAG CUUAAUUGUGCU	700	51-73

AD-1479445.1	AAUUAAGCUCCUUCUUUUU AU	42	56-76	ATAAAAAGAAGG AGCUUAAUUGU	708	54-76
AD-1479446.1	AAUUAAGCUCCUUCUUUUU AA	634	56-76	UTAAAAAGAAGG AGCUUAAUUGU	709	54-76
AD-1479447.1	AAUUAAGCUCCUUCUUUUU AU	42	56-76	ATAAAAAGAAGG AGCTUAAUUGU	710	54-76
AD-1479448.1	AAUUAAGCUCCUUCUUUUU AA	634	56-76	UTAAAAAGAAGG AGCTUAAUUGU	711	54-76
AD-1479449.1	AAUUAAGCUCCUUCUUUUU AU	42	56-76	ATAAAAAGAAGG AGCUUAAUUGU	708	54-76
AD-1479450.1	AAUUAAGCUCCUUCUUUUU AU	42	56-76	ATAAAAAGAAGG AGCUUAAUUGU	708	54-76
AD-1479451.1	UUAAGCUCCUUCUUUUUAU	635	58-76	ATAAAAAGAAGG AGCUAAAUU	712	56-76
AD-1479452.1	UUAAGCUCCUUCUUUUUAU	635	58-76	ATAAAAAGAAGG AGCTUAAUU	713	56-76
AD-1479453.1	UUAAGCUCCUUCUUUUUAU	635	58-76	ATAAAAAGAAGG AGCUAAAUU	712	56-76
AD-1479454.1	UUAAGCUCCUUCUUUUUAU	635	58-76	ATAAAAAGAAGG AGCTUAAUU	713	56-76
AD-1479455.1	AAUUUAGCUCCUUCUUUUU AU	636	56-76	ATAAAAAGAAGG AGCUAAAUUGU	714	54-76

AD-1479456.1	AAUAAAGCUCCUUCUUUUU AU	637	56-76	ATAAAAAGAAGG AGCUUUAUUGU	715	54-76
AD-1479457.1	AAAUAAGCUCCUUCUUUUU AU	638	56-76	ATAAAAAGAAGG AGCUUUAUUGU	716	54-76
AD-1479458.1	UUUGAUCAGUCUUUUUAUG AU	75	312-332	AUCATAAAAAGA CUGAUCAAAUG	717	310-332
AD-1479459.1	UUUGAUCAGUCUUUUUAUG AA	639	279-299	UUCATAAAAAGA CUGAUCAAAUG	718	277-299
AD-1479460.1	UUUGAUCAGUCUUUUUAUG AU	75	312-332	ATCATAAAAAGA CUGAUCAAAUG	719	310-332
AD-1479461.1	UUUGAUCAGUCUUUUUAUG AU	75	312-332	ATCAUAAAAGA CUGAUCAAAUG	720	310-332
AD-1479462.1	UUUGAUCAGUCUUUUUAUG AU	75	312-332	ATCATAAAAAGA CUGAUCAAAUG	719	310-332
AD-1479463.1	UUUGAUCAGUCUUUUUAUG AA	639	279-299	UTCATAAAAAGA CUGAUCAAAUG	721	277-299
AD-1479464.1	UUUGAUCAGUCUUUUUAUG AU	75	312-332	ATCAUAAAAGA CUGAUCAAAUG	720	310-332
AD-1479465.1	UUUGAUCAGUCUUUUUAUG AU	75	312-332	ATCAUAAAAGA CTGAUCAAAUG	722	310-332
AD-1479466.1	UUUGAUCAGUCUUUUUAUG AU	75	312-332	ATCATAAAAAGA CUGAUCAAAUG	719	310-332

AD-1479467.1	UGAUCAGUCUUUUUAUGA U	640	280-299	ATCAUAAAAAGA CUGAUCAACU	723	278-299
AD-1479468.1	UUUGAUCAGUCUUUUUAUG AU	75	279-299	ATCATAAAAAGA CUGAUCAAACU	724	277-299
AD-1479469.1	UUUGAUCAGUCUUUUUAUG AU	75	279-299	ATCATAAAAAGA CUGAUCAAACU	724	277-299
AD-1479470.1	UUUGUUCAGUCUUUUUAUG AU	641	279-299	ATCATAAAAAGA CUGAACAAAUG	725	277-299
AD-1479471.1	UUUCAUCAGUCUUUUUAUG AU	642	279-299	ATCATAAAAAGA CUGAUGAAAUG	726	277-299
AD-1479472.1	UUAGAUCAGUCUUUUUAUG AU	643	279-299	ATCATAAAAAGA CUGAUCUAAUG	727	277-299
AD-1479473.1	UUUGAUCAGUCUUUUUAUG AU	75	279-299	ATCATAAAAAGA CUGAUCAAACU	724	277-299
AD-1479474.1	CAGAAGUAACUUCACUAAA AA	100	556-576	UTUUAAGUGAAG UUACUUCUGGG	728	554-576
AD-1479475.1	CAGAAGUAACUUCACUAAA AA	100	556-576	UTUUAAGUGAAG UUACUUCUGGG	728	554-576
AD-1479476.1	CAGAAGUAACUUCACUAAA AA	100	556-576	UTUUAAGUGAAG UUACUUCUGGG	728	554-576
AD-1479477.1	CAGAAGUAACUUCACUAAA AA	100	556-576	UTUUAAGUGAAG UTACUUCUGGG	729	554-576

AD-1479478.1	GAAGUAACUUCACUAAAA	644	525-543	UTUUAAGUGAAG UUACUUCUG	730	523-543
AD-1479479.1	CAGAAGUAACUUCACUAAA AA	100	523-543	UTUUAAGUGAAG UUACUUCUGGG	728	521-543
AD-1479480.1	CAGAAGUAACUUCACUAAA AA	100	523-543	UTUUAAGUGAAG UUACUUCUGGG	728	521-543
AD-1479481.1	CAGAAGUAACUUCACUAAA AA	100	523-543	UTUUAAGUGAAG UUACUUCUGGG	728	521-543
AD-1479482.1	CAGAAGUAACUUCACUAAA AA	100	523-543	UTUUAAGUGAAG UUACUUCUGGG	728	521-543
AD-1479483.1	CAGAAGUAACUUCACUAAA AA	100	523-543	UTUUAAGUGAAG UUACUUCUGGG	728	521-543
AD-1479484.1	CAGAAGUAACUUCACUAAA AA	100	556-576	UTUUAAGUGAAG UUACUUCUGGG	728	554-576
AD-1479485.1	CAGAAGUAACUUCACUAAA AA	100	556-576	UTUUAAGUGAAG UUACUUCUGGG	728	554-576
AD-1479486.1	CAGAAGUAACUUCACUAAA AA	100	556-576	UTUUAAGUGAAG UUACUUCUGGG	728	554-576
AD-1479487.1	CAGAAGUAACUUCACUAAA AA	100	556-576	UTUUAAGUGAAG UUACUUCUGGG	728	554-576
AD-1479488.1	CAGAAGUAACUUCACUAAA AA	100	523-543	UTUUAAGUGAAG UUACUUCUGGG	728	521-543

AD-1479489.1	ACCCAGAAGUAACUUCACU UU	97	520-540	AAAGTGAAGUUA CUUCUGGGUGU	731	518-540
AD-1479490.1	ACCCAGAAGUAACUUCACU UU	97	520-540	AAAGTGAAGUUA CUUCUGGGUGU	731	518-540
AD-1479491.1	ACCCAGAAGUAACUUCACU UA	645	520-540	UAAGTGAAGUUA CUUCUGGGUGU	732	518-540
AD-1479492.1	ACCCAGAAGUAACUUCACU UA	645	520-540	UAAGTGAAGUUA CUUCUGGGUGU	732	518-540
AD-1479493.1	ACCCAGAAGUAACUUUACU UU	646	520-540	AAAGTAAAGUUA CUUCUGGGUGU	733	518-540
AD-1479494.1	ACCCAGAAGUAACUUCACU UU	97	520-540	AAAGTGAAGUUA CUUCUGGGUGU	731	518-540
AD-1479495.1	ACCCAGAAGUAACUUCACU UU	97	520-540	AAAGTGAAGUUA CUUCUGGGUGU	731	518-540
AD-1479496.1	ACCCAGAAGUAACUUCACU UU	97	520-540	AAAGTGAAGUUA CUUCUGGGUCU	734	518-540
AD-1479497.1	ACCCAGAAGUAACUUCACU UU	97	520-540	AAAGTGAAGUUA CUUCUGGGUCU	734	518-540
AD-1479498.1	ACCCAGAAGUAACUUCACU UU	97	520-540	AAAGTGAAGUUA CUUCUGGGUCU	734	518-540
AD-1479499.1	ACCCAGAAGUAACUUCACU UU	97	520-540	AAAGTGAAGUUA CUUCUGGGUCU	734	518-540

AD-1479500.1	CCAGAAGUAACUUCACUUU	647	522-540	AAAGTGAAGUUA CUUCUGGGU	735	520-540
AD-1479501.1	CCAGAAGUAACUUCACUUU	647	522-540	AAAGTGAAGUUA CUUCUGGGU	735	520-540
AD-1479502.1	CCAGAAGUAACUUCACUUU	647	522-540	AAAGTGAAGUUA CUUCUGGGU	735	520-540
AD-1479503.1	CCAGAAGUAACUUCACUUU	647	522-540	AAAGTGAAGUUA CUUCUGGGU	735	520-540
AD-1479504.1	ACCCUGAAGUAACUUCACU UU	648	520-540	AAAGTGAAGUUA CUUCAGGGUGU	736	518-540
AD-1479505.1	ACCGAGAAGUAACUUCACU UU	649	520-540	AAAGTGAAGUUA CUUCUCGGUGU	737	518-540
AD-1479506.1	ACGCAGAAGUAACUUCACU UU	650	520-540	AAAGTGAAGUUA CUUCUGCGUGU	738	518-540
AD-1479507.1	ACCCAGAAGUAACUUCACU UU	97	520-540	AAAGTGAAGUUA CUUCUGGGUGU	731	518-540
AD-1479508.1	ACCCAGAAGUAACUUCACU UU	97	520-540	AAAGTGAAGUUA CUUCUGGGUGU	731	518-540
AD-1479509.1	AGAAGUAACUUCACUAAAA AU	101	524-544	AUUUTAAGUGAA GUUACUUCUGG	739	522-544
AD-1479510.1	AGAAGUAACUUCACUAAAA AU	101	524-544	AUUUTAAGUGAA GUUACUUCUGG	739	522-544

AD-1479511.1	AGAAGUAACUUCACUUAAA AU	101	524-544	AUUUTAAGUGAA GUUACUUCUGG	739	522-544
AD-1479512.1	AGAAGUAACUUCACUUAAA AU	101	524-544	AUUUTAAGUGAA GUUACUUCUGG	739	522-544
AD-1479513.1	AGAAGUAACUUCACUUAAA AA	651	524-544	UUUUTAAGUGAA GUUACUUCUGG	740	522-544
AD-1479514.1	AGAAGUAACUUCACUUAAA AA	651	524-544	UUUUTAAGUGAA GUUACUUCUGG	740	522-544
AD-1479515.1	AGAAGUAACUUCACUUAAA AU	101	524-544	AUUUTAAGUGAA GUUACUUCUGG	739	522-544
AD-1479516.1	AGAAGUAACUUCACUUAAA AU	101	524-544	AUUUTAAGUGAA GUUACUUCUGG	739	522-544
AD-1479517.1	AGAAGUAACUUCACUUAAA AU	101	524-544	ATUUTAAGUGAA GUUACUUCUGG	741	522-544
AD-1479518.1	AGAAGUAACUUCACUUAAA AU	101	524-544	ATUUTAAGUGAA GUUACUUCUGG	741	522-544
AD-1479519.1	AGAAGUAACUUCACUUAAA AU	101	524-544	ATUUTAAGUGAA GUUACUUCUGG	741	522-544
AD-1479520.1	AGAAGUAACUUCACUUAAA AU	101	524-544	ATUUTAAGUGAA GUUACUUCUGG	741	522-544
AD-1479521.1	AGAAGUAACUUCACUUAAA AU	101	524-544	ATUUTAAGUGAA GUUACUUCUCU	742	522-544

AD-1479522.1	AGAAGUAACUUCACUUAAA AU	101	524-544	ATUUTAAGUGAA GUUACUUCUCU	742	522-544
AD-1479523.1	AAGUAACUUCACUAAAAU	652	526-544	ATUUTAAGUGAA GUUACUUCU	743	524-544
AD-1479524.1	AAGUAACUUCACUAAAAU	652	526-544	ATUUTAAGUGAA GUUACUUCU	743	524-544
AD-1479525.1	AGAACUAACUUCACUAAA AU	653	524-544	AUUUTAAGUGAA GUUAGUUCUGG	744	522-544
AD-1479526.1	AGAUGUAACUUCACUAAA AU	654	524-544	AUUUTAAGUGAA GUUACAUCUGG	745	522-544
AD-1479527.1	AGUAGUAACUUCACUAAA AU	655	524-544	AUUUTAAGUGAA GUUACUACUGG	746	522-544
AD-1479528.1	AUUUGCUAUGUUAGACGAU GU	115	155-175	ACAUCGTCUAAC AUAGCAAUCU	224	153-175
AD-1479529.1	AUUUGCUAUGUUAGACGAU GU	115	155-175	ACAUCGUCUAAC AUAGCAAUCU	747	153-175
AD-1479530.1	AUUUGCUAUGUUAGACGAU GA	656	155-175	UCAUCGTCUAAC AUAGCAAUCU	748	153-175
AD-1479531.1	AUUUGCUAUGUUAGACGAU GA	656	155-175	UCAUCGUCUAAC AUAGCAAUCU	749	153-175
AD-1479532.1	AUUUGCUAUGUUAGACGAU GA	656	155-175	UCAUCGTCUAAC AUAGCAAUCU	748	153-175

AD-1479533.1	AUUUGCUAUGUUAGACGAU GA	656	155-175	UCAUCGUCUAAC AUAGCAAUCU	749	153-175
AD-1479534.1	UUGCUAUGUUAGACGAUGU	657	157-175	ACAUCGTCUAAC AUAGCAAGU	750	155-175
AD-1479535.1	UUGCUAUGUUAGACGAUGU	657	157-175	ACAUCGUCUAAC AUAGCAAGU	751	155-175
AD-1479536.1	AUUUCCUAUGUUAGACGAU GU	658	155-175	ACAUCGUCUAAC AUAGGAAUCU	752	153-175
AD-1479537.1	AUUAGCUAUGUUAGACGAU GU	659	155-175	ACAUCGUCUAAC AUAGCUAAUCU	753	153-175
AD-1479538.1	AUAUGCUAUGUUAGACGAU GU	660	155-175	ACAUCGUCUAAC AUAGCAUAUCU	754	153-175

Таблица 8. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК против ANGPTL3

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO:
AD-1331203.3	usgsuuccaCfaAfUfUfaa gcuccuuuL96	270	asAfsagdGa(G2p)cuuaauUfg Ufgaacasusu	378	AAUGUUCACAAUUAAGCUCCU UC	509
AD-1331206.3	csascaauUfaAfGfCfuc cuucuuuuL96	274	asAfsaagAfaaggagcuUfaAfuu gugsasa	382	UUCACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	513

AD-1331209.3	asasuuaaGfcUfCfCfuucuuuuuauL96	277	asUfsaaaAfagaaggaGfcUfuauuusgsu	385	ACAAUUAAGCUCCUUCUUUUUAU	516
AD-1331212.3	asasgcucCfuUfCfUfuuuauuguuL96	25	asAfscaaUfaaaaagaAfgGfagcuusasa	22	UUAAGCUCCUUCUUUUUAUUGUU	520
AD-1331213.3	asgscuccUfuCfUfUfuuuauuguuL96	281	asAfsacaAfuaaaaagAfaGfgagcususa	24	UAAGCUCCUUCUUUUUAUUGUUC	521
AD-1331240.3	ususugauCfaGfUfCfuuuuuauL96	309	asUfscAUfaaaagacUfgAfucuaasusa	416	UAUUUGAUCAGUCUUUUUAU	549
AD-1331262.3	ascscagAfaGfUfAfacuucacuuuL96	331	asAfsaguGfaaguuacUfuCfuggusgsu	438	ACACCCAGAAGUAACUUCACUUA	571
AD-1331264.3	cscsagaaGfuAfAfCfuucacuuuuL96	333	usUfsuadAg(Tgn)gaaguuAfcUfucuggsgsu	440	ACCCAGAAGUAACUUCACUUA	573
AD-1331265.3	csasgaagUfaAfCfUfucacuuuuuuL96	334	usUfsuudAa(G2p)ugaaguUfaCfuucugsgsg	441	CCCAGAAGUAACUUCACUUA	574
AD-1331266.3	asgsaaguAfaCfUfUfcauuuuuuL96	335	asUfsuuuAfagugaagUfuAfcuucusgsg	442	CCAGAAGUAACUUCACUUA	575
AD-1331329.3	asusuugcuaUfGfUfuaagacgauguL96	349	asdCsaudCgdTcuaadCadTadGcaaauscsu	480	AGAUUUGCUAUGUUAGACGAUGU	589
AD-1479370.1	asasgcuccuUfCfUfuuuuauuguuL96	20	asdAscAdAudAaaaadGaAfggagcuusasa	825	UUAAGCUCCUUCUUUUUAUUGUU	520
AD-1479371.1	asasgcuccuUfCfUfuuuuauuguuL96	20	asdAscAdAudAaaaadGadAgdGagcuusasa	826	UUAAGCUCCUUCUUUUUAUUGUU	520

AD-1479372.1	asasgcuccuUfCfUfuuu uauuguuL96	20	asdAscadAudAaaaadGaAfgg agcuusgsg	19	UUAAGCUCCUUCUUUUUUAUUG UU	520
AD-1479373.1	asasgcuccuUfCfUfuuu uauuguuL96	20	asdAscadAudAaaaadGadAgd Gagcuusgsg	827	UUAAGCUCCUUCUUUUUUAUUG UU	520
AD-1479374.1	asasgcuccuUfCfUfuuu uauuguaL96	755	usdAscadAudAaaaadGaAfgg agcuusgsg	828	UUAAGCUCCUUCUUUUUUAUUG UU	520
AD-1479375.1	asasgcuccuUfCfUfuuu uauuguaL96	755	usdAscadAudAaaaadGadAgd Gagcuusgsg	829	UUAAGCUCCUUCUUUUUUAUUG UU	520
AD-1479376.1	asasgcuccuUfCfUfuuu uauuguuL96	20	asdAscadAudAaaaadGaAfgg agcuuscsu	830	UUAAGCUCCUUCUUUUUUAUUG UU	520
AD-1479377.1	asasgcuccuUfCfUfuuu uauuguuL96	20	asdAscadAudAaaaadGadAgd Gagcuuscsu	831	UUAAGCUCCUUCUUUUUUAUUG UU	520
AD-1479378.1	gscsuccuUfCfUfuuuua uuguuL96	756	asdAscadAudAaaaadGaAfgg agcsusu	832	AAGCUCCUUCUUUUUUAUUGUU	977
AD-1479379.1	gscsuccuUfCfUfuuuua uuguuL96	756	asdAscadAudAaaaadGadAgd Gagcsusu	833	AAGCUCCUUCUUUUUUAUUGUU	977
AD-1479380.1	asasgcaccuUfCfUfuuu uauuguuL96	757	asdAscadAudAaaaadGaAfgg ugcuuscsu	834	UUAAGCUCCUUCUUUUUUAUUG UU	520
AD-1479381.1	asasgguccuUfCfUfuuu uauuguuL96	758	asdAscadAudAaaaadGaAfgg accuuscsu	835	UUAAGCUCCUUCUUUUUUAUUG UU	520
AD-1479382.1	asasccuccuUfCfUfuuu uauuguuL96	759	asdAscadAudAaaaadGaAfgg agguuscsu	836	UUAAGCUCCUUCUUUUUUAUUG UU	520

AD-1479383.1	asgscuccuuCfUfUfuuu auuguuuL96	760	asdAsacdAadTaaaadAgAfag gagcususa	837	UAAGCUCCUUCUUUUUAUUGU UC	521
AD-1479384.1	asgscuccuuCfUfUfuuu auuguuuL96	760	asdAsacdAadTaaaadAgdAad Ggagcususa	838	UAAGCUCCUUCUUUUUAUUGU UC	521
AD-1479385.1	asgscuccuuCfUfUfuuu auuguuuL96	760	asdAsacdAadTaaaadAgAfag gagcususg	839	UAAGCUCCUUCUUUUUAUUGU UC	521
AD-1479386.1	asgscuccuuCfUfUfuuu auuguuuL96	760	asdAsacdAadTaaaadAgdAad Ggagcususg	840	UAAGCUCCUUCUUUUUAUUGU UC	521
AD-1479387.1	asgscuccuuCfUfUfuuu auuguuaL96	761	usdAsacdAadTaaaadAgAfag gagcususg	841	UAAGCUCCUUCUUUUUAUUGU UC	521
AD-1479388.1	asgscuccuuCfUfUfuuu auuguuaL96	761	usdAsacdAadTaaaadAgdAad Ggagcususg	842	UAAGCUCCUUCUUUUUAUUGU UC	521
AD-1479389.1	asgscuccuuCfUfUfuuu auuguuuL96	760	asdAsacdAadTaaaadAgAfag gagcuscsu	843	UAAGCUCCUUCUUUUUAUUGU UC	521
AD-1479390.1	asgscuccuuCfUfUfuuu auuguuuL96	760	asdAsacdAadTaaaadAgdAad Ggagcuscsu	844	UAAGCUCCUUCUUUUUAUUGU UC	521
AD-1479391.1	csusccuuCfUfUfuuuau uguuuL96	762	asdAsacdAadTaaaadAgAfag gagscsu	845	AGCUCCUUCUUUUUAUUGUUC	978
AD-1479392.1	csusccuuCfUfUfuuuau uguuuL96	762	asdAsacdAadTaaaadAgdAad Ggagscsu	846	AGCUCCUUCUUUUUAUUGUUC	978
AD-1479393.1	asgscugcuuCfUfUfuu uauuguuuL96	763	asdAsacdAadTaaaadAgAfag cagcuscsu	847	UAAGCUCCUUCUUUUUAUUGU UC	521

AD-1479394.1	asgscaccuuCfUfUfuuu auuguuuL96	764	asdAsacdAadTaaaadAgAfag gugcuscsu	848	UAAGCUCCUUCUUUUUAUUGU UC	521
AD-1479395.1	asgsguccuuCfUfUfuuu uauuguuuL96	765	asdAsacdAadTaaaadAgAfag guccuscsu	849	UAAGCUCCUUCUUUUUAUUGU UC	521
AD-1479396.1	cscsagaaguAfAfCfuuc acuuuuuuL96	766	usUfsuadAg(Tgn)gaaguuAfc Ufucuggsgsu	440	ACCCAGAAGUAACUUCACUUA AA	573
AD-1479397.1	cscsagaaguAfAfCfuuc acuuuuuuL96	766	usdTsuadAg(Tgn)gaaguuAfc Ufucuggsgsu	850	ACCCAGAAGUAACUUCACUUA AA	573
AD-1479398.1	cscsagaaguAfAfCfuuc acuuuuuuL96	766	usUfsuadAg(Tgn)gaagdTuAf cuucuggsgsu	851	ACCCAGAAGUAACUUCACUUA AA	573
AD-1479399.1	cscsagaaguAfAfCfuuc acuuuuuuL96	766	usUfsuadAg(Tgn)gaagdTudA cdTucuggsgsu	852	ACCCAGAAGUAACUUCACUUA AA	573
AD-1479400.1	cscsagaaguAfAfCfuuc acuuuuuuL96	766	usdTsuadAg(Tgn)gaaguuAfc Ufucuggscsu	853	ACCCAGAAGUAACUUCACUUA AA	573
AD-1479401.1	cscsagaaguAfAfCfuuc acuuuuuuL96	766	usUfsuadAg(Tgn)gaagdTuAf cuucuggscsu	854	ACCCAGAAGUAACUUCACUUA AA	573
AD-1479402.1	asgsaaguAfAfCfuucac uuuuuuL96	767	usdTsuadAg(Tgn)gaaguuAfc Ufucusgsg	855	CCAGAAGUAACUUCACUUA AAA	979
AD-1479403.1	asgsaaguAfAfCfuucac uuuuuuL96	767	usUfsuadAg(Tgn)gaagdTuAf cuucusgsg	856	CCAGAAGUAACUUCACUUA AAA	979
AD-1479404.1	cscsagaaguAfAfCfuuc acuuuuuuL96	766	usdTsuadAg(Tgn)gaagdTuAf cuucuggsgsu	857	ACCCAGAAGUAACUUCACUUA AA	573

AD-1479405.1	asgsaaguAfAfCfuucacuuuuuL96	767	usdTsuadAg(Tgn)gaagdTuAfcuucugsgsg	858	CCAGAAGUAAACUUCACUAAA	979
AD-1479406.1	cscsagaagudAaCfuucauuuuuL96	768	usUfsuadAg(Tgn)gaaguuAfcUfucuggsgsu	440	ACCCAGAAGUAAACUUCACUAA	573
AD-1479407.1	cscsagaagudAaCfUfucacuuuuuL96	769	usUfsuadAg(Tgn)gaaguuAfcUfucuggsgsu	440	ACCCAGAAGUAAACUUCACUAA	573
AD-1479408.1	cscsagaagudAaCfuucauuuuuL96	768	usdTsuadAg(Tgn)gaagdTuAfcuucuggsgsu	857	ACCCAGAAGUAAACUUCACUAA	573
AD-1479409.1	cscsagaagudAaCfUfucacuuuuuL96	769	usdTsuadAg(Tgn)gaagdTuAfcuucuggsgsu	857	ACCCAGAAGUAAACUUCACUAA	573
AD-1479410.1	cscsagaagudAaCfuucauuuuuL96	768	usdTsuadAg(U2p)gaagdTuAfcuucuggscsu	859	ACCCAGAAGUAAACUUCACUAA	573
AD-1479411.1	cscsagaagudAaCfUfucacuuuuuL96	769	usdTsuadAg(U2p)gaagdTuAfcuucuggscsu	859	ACCCAGAAGUAAACUUCACUAA	573
AD-1479412.1	cscsaguaguAfAfCfuucacuuuuuL96	770	usUfsuadAg(Tgn)gaaguuAfcUfacuggsgsu	860	ACCCAGAAGUAAACUUCACUAA	573
AD-1479413.1	cscsacaaguAfAfCfuucacuuuuuL96	771	usUfsuadAg(Tgn)gaaguuAfcUfuguggsgsu	861	ACCCAGAAGUAAACUUCACUAA	573
AD-1479414.1	cscsugaaguAfAfCfuucacuuuuuL96	772	usUfsuadAg(Tgn)gaaguuAfcUfucaggsgsu	862	ACCCAGAAGUAAACUUCACUAA	573
AD-1479415.1	usgsuuaCfaAfUfUfaa gcuuuuuL96	270	asdAsagdGa(G2p)cuuaauUfgUfgaacasusu	863	AAUGUUCACAAUUAAGCUCCUUC	509

AD-1479416.1	usgsuucacaAfUfUfaag cuccuuuL96	773	asdAsagdGa(G2p)cuuadAuU fgugaacasusu	864	AAUGUUCACAAUUAAGCUCCU UC	509
AD-1479417.1	usgsuucacaAfUfUfaag cuccuuuL96	773	asdAsagdGa(G2p)cuuadAuU fgUfgaacasusu	865	AAUGUUCACAAUUAAGCUCCU UC	509
AD-1479418.1	usgsuucacaAfUfUfaag cuccuuuL96	773	asdAsagdGa(G2p)cuuadAud TgdTgaacasusu	866	AAUGUUCACAAUUAAGCUCCU UC	509
AD-1479419.1	usgsuucacaAfUfUfaag cuccuuuL96	773	asdAsagdGa(G2p)cuuadAud TgdTgaacascsu	867	AAUGUUCACAAUUAAGCUCCU UC	509
AD-1479420.1	usgsuucaCfaAfUfUfaa gcuccuuuL96	270	asAfsagdGa(G2p)cuuaauUfg Ufgaacasgsg	868	AAUGUUCACAAUUAAGCUCCU UC	509
AD-1479421.1	usgsuucaCfaAfUfUfaa gcuccuuuL96	270	asdAsagdGa(G2p)cuuaauUfg Ufgaacasgsg	869	AAUGUUCACAAUUAAGCUCCU UC	509
AD-1479422.1	usgsuucacaAfUfUfaag cuccuuuL96	773	asdAsagdGa(G2p)cuuadAuU fgugaacasgsg	870	AAUGUUCACAAUUAAGCUCCU UC	509
AD-1479423.1	usgsuucaCfaAfUfUfaa gcuccuuuL96	270	asAfsagdGa(G2p)cuuaauUfg Ufgaascsg	871	UGUUCACAAUUAAGCUCCUUC	980
AD-1479424.1	usgsuucaCfaAfUfUfaa gcuccuuuL96	270	asdAsagdGa(G2p)cuuaauUfg Ufgaascsg	872	UGUUCACAAUUAAGCUCCUUC	980
AD-1479425.1	usgsuucacaAfUfUfaag cuccuuuL96	773	asdAsagdGa(G2p)cuuadAuU fgugaascsg	873	UGUUCACAAUUAAGCUCCUUC	980
AD-1479426.1	usgsuugaCfaAfUfUfa agcuccuuuL96	774	asdAsagdGa(G2p)cuuaauUfg Ufcaacasusu	874	AAUGUUCACAAUUAAGCUCCU UC	509

AD-1479427.1	usgsuacaCfaAfUfUfaa gcuccuuuL96	775	asdAsagdGa(G2p)cuuaauUfg Ufguacasusu	875	AAUGUUCACAAUUAAGCUCCU UC	509
AD-1479428.1	usgsaucaCfaAfUfUfaa gcuccuuuL96	776	asdAsagdGa(G2p)cuuaauUfg Ufgaucasusu	876	AAUGUUCACAAUUAAGCUCCU UC	509
AD-1479429.1	csascaauuaAfGfCfucc uucuuuuL96	777	asdAsaadGadAggagdCuUfaa uugugsasa	877	UUCACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	513
AD-1479430.1	csascaauuaAfGfCfucc uucuuuuL96	777	asdAsaadGadAggagdCudTad Auugugsasa	878	UUCACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	513
AD-1479431.1	csascaauuaAfGfCfucc uucuuuuL96	777	asdAsaadGadAggagdCuUfaa uugugsgsg	879	UUCACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	513
AD-1479432.1	csascaauuaAfGfCfucc uucuuuuL96	778	usdAsaadGadAggagdCuUfaa uugugsgsg	880	UUCACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	513
AD-1479433.1	csascaauuaAfGfCfucc uucuuuuL96	777	asdAsaadGadAggagdCudTad Auugugsgsg	881	UUCACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	513
AD-1479434.1	csascaauuaAfGfCfucc uucuuuuL96	777	asdAsaadGadAggagdCuUfaa uugugscsu	882	UUCACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	513
AD-1479435.1	csascaauuaAfGfCfucc uucuuuuL96	778	usdAsaadGadAggagdCuUfaa uugugscsu	883	UUCACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	513
AD-1479436.1	csascaauuaAfGfCfucc uucuuuuL96	777	asdAsaadGadAggagdCudTad Auugugscsu	884	UUCACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	513
AD-1479437.1	csasauuaAfGfCfuccuu cuuuuL96	779	asdAsaadGadAggagdCuUfaa uugsusg	885	CACAAUUAAGCUCCUUCUUUU	981

AD-1479438.1	csasauuaAfGfCfuccu cuuuuL96	779	asdAsaadGadAggagdCudTad Auugsusg	886	CACAAUUAAGCUCCUUCUUUU	981
AD-1479439.1	csascauuuaAfGfCfucc uucuuuuL96	780	asdAsaadGadAggagdCuUfaa augugscsu	887	UUCACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	513
AD-1479440.1	csascuauuaAfGfCfucc uucuuuuL96	781	asdAsaadGadAggagdCuUfaa uagugscsu	888	UUCACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	513
AD-1479441.1	csasgaauuaAfGfCfucc uucuuuuL96	782	asdAsaadGadAggagdCuUfaa uucugscsu	889	UUCACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	513
AD-1479442.1	csascauuuadAgCfuccu ucuuuuL96	783	asdAsaadGadAggagdCuUfaa uugugscsu	882	UUCACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	513
AD-1479443.1	csascauuuadAgCfUfcc uucuuuuL96	784	asdAsaadGadAggagdCuUfaa uugugscsu	882	UUCACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	513
AD-1479444.1	csascauuuaAfGfCfucc uucuuuuL96	777	asdAsaadGa(A2p)ggagdCuU faAfuugugscsu	890	UUCACAAUUAAGCUCCUUCUU UU	513
AD-1479445.1	asasuuuagcUfCfCfuuc uuuuuuL96	785	asdTsaadAadAgaagdGaGfcu uaauusgsu	891	ACAAUUAAGCUCCUUCUUUUU AU	516
AD-1479446.1	asasuuuagcUfCfCfuuc uuuuuuL96	786	usdTsaadAadAgaagdGaGfcu uaauusgsu	892	ACAAUUAAGCUCCUUCUUUUU AU	516
AD-1479447.1	asasuuuagcUfCfCfuuc uuuuuuL96	785	asdTsaadAadAgaagdGadGcd Tuaauusgsu	893	ACAAUUAAGCUCCUUCUUUUU AU	516
AD-1479448.1	asasuuuagcUfCfCfuuc uuuuuuL96	786	usdTsaadAadAgaagdGadGcd Tuaauusgsu	894	ACAAUUAAGCUCCUUCUUUUU AU	516

AD-1479449.1	asasuaaagcUfCfCfuuc uuuuuauL96	785	asdTsaadAa(A2p)gaagdGaGf cuuaauusgsu	895	ACAAUUAAGCUCCUUCUUUUU AU	516
AD-1479450.1	asasuaaagcUfCfCfuuc uuuuuauL96	785	asdTsaadAa(A2p)gaagdGaGf cUfuaauusgsu	896	ACAAUUAAGCUCCUUCUUUUU AU	516
AD-1479451.1	ususaagcUfCfCfuucuu uuuauL96	787	asdTsaadAadAgaagdGaGfcu uaasusu	897	AAUUAAGCUCCUUCUUUUU AAU	982
AD-1479452.1	ususaagcUfCfCfuucuu uuuauL96	787	asdTsaadAadAgaagdGadGcd Tuaasusu	898	AAUUAAGCUCCUUCUUUUU AAU	982
AD-1479453.1	ususaagcUfCfCfuucuu uuuauL96	787	asdTsaadAa(A2p)gaagdGaGf cuuaasusu	899	AAUUAAGCUCCUUCUUUUU AAU	982
AD-1479454.1	ususaagcUfCfCfuucuu uuuauL96	787	asdTsaadAa(A2p)gaagdGad GcdTuaasusu	900	AAUUAAGCUCCUUCUUUUU AAU	982
AD-1479455.1	asasuuuagcUfCfCfuuc uuuuuauL96	788	asdTsaadAadAgaagdGaGfcu aaauusgsu	901	ACAAUUAAGCUCCUUCUUUUU AU	516
AD-1479456.1	asasuaaagcUfCfCfuuc uuuuuauL96	789	asdTsaadAadAgaagdGaGfcu uuauusgsu	902	ACAAUUAAGCUCCUUCUUUUU AU	516
AD-1479457.1	asasuaaagcUfCfCfuuc uuuuuauL96	790	asdTsaadAadAgaagdGaGfcu uauusgsu	903	ACAAUUAAGCUCCUUCUUUUU AU	516
AD-1479458.1	ususugauCfaGfUfCfu uuuuauL96	309	asUfscadTa(A2p)aaagacUfg Afucaasusg	904	UAUUUGAUCAGUCUUUUU GAU	549
AD-1479459.1	ususugauCfaGfUfCfu uuuuauL96	791	usUfscadTa(A2p)aaagacUfg Afucaasusg	905	UAUUUGAUCAGUCUUUUU GAU	549

AD-1479460.1	ususugauCfaGfUfCfu uuuuaugauL96	309	asdTscadTa(A2p)aaagacUfg Afucaaasusg	906	UAUUUGAUCAGUCUUUUUAU GAU	549
AD-1479461.1	ususugauCfaGfUfCfu uuuuaugauL96	309	asdTscaua(A2p)aaagacUfgd Aucaasusg	907	UAUUUGAUCAGUCUUUUUAU GAU	549
AD-1479462.1	ususugauCfaGfUfCfu uuuuaugauL96	309	asdTscadTa(A2p)aaagdAcUf gAfucaaasusg	908	UAUUUGAUCAGUCUUUUUAU GAU	549
AD-1479463.1	ususugauCfaGfUfCfu uuuuaugaaL96	791	usdTscadTa(A2p)aaagdAcUf gAfucaaasusg	909	UAUUUGAUCAGUCUUUUUAU GAU	549
AD-1479464.1	ususugauCfaGfUfCfu uuuuaugauL96	309	asdTscaua(A2p)aaagdAcUfg dAucaasusg	910	UAUUUGAUCAGUCUUUUUAU GAU	549
AD-1479465.1	ususugauCfaGfUfCfu uuuuaugauL96	309	asdTscaua(A2p)aaagdAcdTg dAucaasusg	911	UAUUUGAUCAGUCUUUUUAU GAU	549
AD-1479466.1	ususugauCfaGfUfCfu uuuuaugauL96	309	asdTscadTa(A2p)aaagdAcUf gaucaasusg	912	UAUUUGAUCAGUCUUUUUAU GAU	549
AD-1479467.1	ususgauCfaGfUfCfu uuuauL96	792	asdTscaua(A2p)aaagdAcUfg aucaascsu	913	AUUUGAUCAGUCUUUUUAUG AU	983
AD-1479468.1	ususugaucadGuCfUfu uuuauL96	793	asdTscadTa(A2p)aaagdAcUf gAfucaaascsu	914	UAUUUGAUCAGUCUUUUUAU GAU	549
AD-1479469.1	ususugaucagUfCfUfu uuuauL96	794	asdTscadTa(A2p)aaagdAcUf gAfucaaascsu	914	UAUUUGAUCAGUCUUUUUAU GAU	549
AD-1479470.1	ususuguuCfaGfUfCfu uuuuauL96	795	asdTscadTa(A2p)aaagdAcUf gAfacaasusg	915	UAUUUGAUCAGUCUUUUUAU GAU	549

AD-1479471.1	ususucauCfaGfUfCfu uuuuaugauL96	796	asdTscadTa(A2p)aaagdAcUf gAfugaaasusg	916	UAUUUGAUCAGUCUUUUUAU GAU	549
AD-1479472.1	ususagauCfaGfUfCfu uuuuaugauL96	797	asdTscadTa(A2p)aaagdAcUf gAfucuaasusg	917	UAUUUGAUCAGUCUUUUUAU GAU	549
AD-1479473.1	ususugaucaGfUfCfu uuuauL96	798	asdTscadTadAaaagdAcUfgau caaascsu	918	UAUUUGAUCAGUCUUUUUAU GAU	549
AD-1479474.1	csasgaagUfaAfCfUfuc acuuaaaaL96	334	usdTsuudAa(G2p)ugaaguUfa Cfuucugsgsg	919	CCCAGAAGUAACUUCACUAA AA	574
AD-1479475.1	csasgaagUfaAfCfUfuc acuuaaaaL96	334	usdTsuudAa(G2p)ugaadGuU faCfuucugsgsg	920	CCCAGAAGUAACUUCACUAA AA	574
AD-1479476.1	csasgaagUfaAfCfUfuc acuuaaaaL96	334	usdTsuudAa(G2p)ugaadGuU facuucugsgsg	921	CCCAGAAGUAACUUCACUAA AA	574
AD-1479477.1	csasgaagUfaAfCfUfuc acuuaaaaL96	334	usdTsuudAa(G2p)ugaadGud TadCuucugsgsg	922	CCCAGAAGUAACUUCACUAA AA	574
AD-1479478.1	gsasagUfaAfCfUfucac uuuaaaaL96	799	usdTsuudAa(G2p)ugaadGuU facuucsusg	923	CAGAAGUAACUUCACUAAAA	984
AD-1479479.1	csasgaagUfadACfUfu cacuuuaaaaL96	800	usdTsuudAa(G2p)ugaadGuU facuucugsgsg	921	CCCAGAAGUAACUUCACUAA AA	574
AD-1479480.1	csasgaagUfadAcUfuca cuuaaaaL96	801	usdTsuudAa(G2p)ugaadGuU facuucugsgsg	921	CCCAGAAGUAACUUCACUAA AA	574
AD-1479481.1	csasgaaguadAcUfucac uuuaaaaL96	802	usdTsuudAa(G2p)ugaadGuU facuucugsgsg	921	CCCAGAAGUAACUUCACUAA AA	574

AD-1479482.1	csasgaaguadAcUfUfca cuuaaaaL96	803	usdTsuudAa(G2p)ugaadGuU facuucugsgsg	921	CCCAGAAGUAACUUCACUCAA AA	574
AD-1479483.1	csasgaaguaaCfUfUfca cuuaaaaL96	804	usdTsuudAa(G2p)ugaadGuU facuucugsgsg	921	CCCAGAAGUAACUUCACUCAA AA	574
AD-1479484.1	csasgaagUfaAfCfUfuc acuuaaaaL96	334	usdTsuudAa(G2p)ugaadGu(U2p)aCfuucugsgsg	924	CCCAGAAGUAACUUCACUCAA AA	574
AD-1479485.1	csasgaagUfaAfCfUfuc acuuaaaaL96	334	usdTsuudAa(G2p)ugaadGuU f(A2p)Cfuucugsgsg	925	CCCAGAAGUAACUUCACUCAA AA	574
AD-1479486.1	csasgaagUfaAfCfUfuc acuuaaaaL96	334	usdTsuudAa(G2p)ugaadGuU fa(C2p)uucugsgsg	926	CCCAGAAGUAACUUCACUCAA AA	574
AD-1479487.1	csasgaagUfaAfCfUfuc acuuaaaaL96	334	usdTsuudAa(G2p)ugaadGuU faCf(U2p)ucugsgsg	927	CCCAGAAGUAACUUCACUCAA AA	574
AD-1479488.1	csasgaaguaAfCfUfuca cuuaaaaL96	805	usdTsuudAadGugaadGuUfac uucugsgsg	928	CCCAGAAGUAACUUCACUCAA AA	574
AD-1479489.1	ascscagaaGfUfAfacu ucacuuuL96	806	asAfsagdTg(Agn)aguuacUfu Cfugggusgsu	929	ACACCCAGAAGUAACUUCACU UA	571
AD-1479490.1	ascscagaaGfUfAfacu ucacuuuL96	806	asAfsagdTg(A2p)aguuacUfu Cfugggusgsu	930	ACACCCAGAAGUAACUUCACU UA	571
AD-1479491.1	ascscagaaGfUfAfacu ucacuuuL96	807	usAfsagdTg(Agn)aguuacUfu Cfugggusgsu	931	ACACCCAGAAGUAACUUCACU UA	571
AD-1479492.1	ascscagaaGfUfAfacu ucacuuuL96	807	usAfsagdTg(A2p)aguuacUfu Cfugggusgsu	932	ACACCCAGAAGUAACUUCACU UA	571

AD-1479493.1	ascscagaaGfUfAfacu uuacuuuL96	808	asAfsagdTadAaguuaCufu gggusgsu	933	ACACCCAGAAGUAACUUCACU UA	571
AD-1479494.1	ascscagaaGfUfAfacu ucacuuuL96	806	asdAsagdTg(Agn)aguuaCufu Cfugggusgsu	934	ACACCCAGAAGUAACUUCACU UA	571
AD-1479495.1	ascscagaaGfUfAfacu ucacuuuL96	806	asdAsagdTg(A2p)aguuaCufu Cfugggusgsu	935	ACACCCAGAAGUAACUUCACU UA	571
AD-1479496.1	ascscagaaGfUfAfacu ucacuuuL96	806	asdAsagdTg(Agn)aguuaCufu Cfuggguscsu	936	ACACCCAGAAGUAACUUCACU UA	571
AD-1479497.1	ascscagaaGfUfAfacu ucacuuuL96	806	asdAsagdTg(A2p)aguuaCufu Cfuggguscsu	937	ACACCCAGAAGUAACUUCACU UA	571
AD-1479498.1	ascscagaaGfUfAfacu ucacuuuL96	806	asAfsagdTg(A2p)aguuaCufu Cfuggguscsu	938	ACACCCAGAAGUAACUUCACU UA	571
AD-1479499.1	ascscagaaGfUfAfacu ucacuuuL96	806	asdAsagdTg(A2p)aguudAcU fuCfuggguscsu	939	ACACCCAGAAGUAACUUCACU UA	571
AD-1479500.1	cscsagaaGfUfAfacuuc acuuuL96	809	asdAsagdTg(Agn)aguuaCufu Cfugggsgsu	940	ACCCAGAAGUAACUUCACUUA	985
AD-1479501.1	cscsagaaGfUfAfacuuc acuuuL96	809	asdAsagdTg(A2p)aguuaCufu Cfugggsgsu	941	ACCCAGAAGUAACUUCACUUA	985
AD-1479502.1	cscsagaaGfUfAfacuuc acuuuL96	809	asAfsagdTg(A2p)aguuaCufu Cfugggsgsu	942	ACCCAGAAGUAACUUCACUUA	985
AD-1479503.1	cscsagaaGfUfAfacuuc acuuuL96	809	asdAsagdTg(A2p)aguudAcU fuCfugggsgsu	943	ACCCAGAAGUAACUUCACUUA	985

AD-1479504.1	ascscugaaGfUfAfacu ucacuuuL96	810	asdAsagdTg(A2p)aguuacUfu Cfagggusgsu	944	ACACCCAGAAGUAACUUCACU UA	571
AD-1479505.1	ascscgagaaGfUfAfacu ucacuuuL96	811	asdAsagdTg(A2p)aguuacUfu Cfucggusgsu	945	ACACCCAGAAGUAACUUCACU UA	571
AD-1479506.1	ascsgcagaaGfUfAfacu ucacuuuL96	812	asdAsagdTg(A2p)aguuacUfu Cfugcgusgsu	946	ACACCCAGAAGUAACUUCACU UA	571
AD-1479507.1	ascscagaagUfAfAfcu ucacuuuL96	813	asdAsagdTg(Agn)aguuacUfu Cfuggusgsu	934	ACACCCAGAAGUAACUUCACU UA	571
AD-1479508.1	ascscagaagUfAfAfcu ucacuuuL96	813	asdAsagdTg(A2p)aguuacUfu Cfuggusgsu	935	ACACCCAGAAGUAACUUCACU UA	571
AD-1479509.1	asgsaaguaaCfUfUfcac uuaaaauL96	814	asUfsuudTa(Agn)gugaagUfu Afcuucusgsg	947	CCAGAAGUAACUUCACUUAAA AC	575
AD-1479510.1	asgsaaguaaCfUfUfcac uuaaaauL96	814	asUfsuudTa(A2p)gugaagUfu Afcuucusgsg	948	CCAGAAGUAACUUCACUUAAA AC	575
AD-1479511.1	asgsaaguaaCfUfUfcac uuaaaauL96	814	asUfsuudTa(Agn)gugadAgUf uAfcuucusgsg	949	CCAGAAGUAACUUCACUUAAA AC	575
AD-1479512.1	asgsaaguaaCfUfUfcac uuaaaauL96	814	asUfsuudTa(A2p)gugadAgUf uAfcuucusgsg	950	CCAGAAGUAACUUCACUUAAA AC	575
AD-1479513.1	asgsaaguaaCfUfUfcac uuaaaaaL96	815	usUfsuudTa(Agn)gugadAgUf uAfcuucusgsg	951	CCAGAAGUAACUUCACUUAAA AC	575
AD-1479514.1	asgsaaguaaCfUfUfcac uuaaaaaL96	815	usUfsuudTa(A2p)gugadAgUf uAfcuucusgsg	952	CCAGAAGUAACUUCACUUAAA AC	575

AD-1479515.1	asgsaaguaaCfUfUfcac uuaaaauL96	814	asUfsuudTa(Agn)gugadAgUf uacuucusgsg	953	CCAGAAGUAACUUCACUUAAA AC	575
AD-1479516.1	asgsaaguaaCfUfUfcac uuaaaauL96	814	asUfsuudTa(A2p)gugadAgUf uacuucusgsg	954	CCAGAAGUAACUUCACUUAAA AC	575
AD-1479517.1	asgsaaguaaCfUfUfcac uuaaaauL96	814	asdTsuudTa(Agn)gugadAgUf uAfcuucusgsg	955	CCAGAAGUAACUUCACUUAAA AC	575
AD-1479518.1	asgsaaguaaCfUfUfcac uuaaaauL96	814	asdTsuudTa(A2p)gugadAgUf uAfcuucusgsg	956	CCAGAAGUAACUUCACUUAAA AC	575
AD-1479519.1	asgsaaguaaCfUfUfcac uuaaaauL96	814	asdTsuudTa(Agn)gugadAgUf uacuucusgsg	957	CCAGAAGUAACUUCACUUAAA AC	575
AD-1479520.1	asgsaaguaaCfUfUfcac uuaaaauL96	814	asdTsuudTa(A2p)gugadAgUf uacuucusgsg	958	CCAGAAGUAACUUCACUUAAA AC	575
AD-1479521.1	asgsaaguaaCfUfUfcac uuaaaauL96	814	asdTsuudTa(A2p)gugadAgUf uAfcuucuscsu	959	CCAGAAGUAACUUCACUUAAA AC	575
AD-1479522.1	asgsaaguaaCfUfUfcac uuaaaauL96	814	asdTsuudTa(A2p)gugadAgUf uacuucuscsu	960	CCAGAAGUAACUUCACUUAAA AC	575
AD-1479523.1	asasguaaCfUfUfcacuu aaaauL96	816	asdTsuudTa(A2p)gugadAgUf uAfcuuscsu	961	AGAAGUAACUUCACUUAAAAC	986
AD-1479524.1	asasguaaCfUfUfcacuu aaaauL96	816	asdTsuudTa(A2p)gugadAgUf uacuuscsu	962	AGAAGUAACUUCACUUAAAAC	986
AD-1479525.1	asgsaacuaaCfUfUfcac uuaaaauL96	817	asUfsuudTa(A2p)gugaagUfu Afguucusgsg	963	CCAGAAGUAACUUCACUUAAA AC	575

AD-1479526.1	asgsauguaaCfUfUfcac uuaaaauL96	818	asUfsuudTa(A2p)gugaagUfu Afcaucusgsg	964	CCAGAAGUAACUUCACUUAAA AC	575
AD-1479527.1	asgsuaguaaCfUfUfcac uuaaaauL96	819	asUfsuudTa(A2p)gugaagUfu Afcuacusgsg	965	CCAGAAGUAACUUCACUUAAA AC	575
AD-1479528.1	asusuugcuaUfGfUfua gacgauguL96	349	asdCsaudCg(Tgn)cuaadCaUf adGcaaauscsu	966	AGAUUUGCUAUGUUAGACGA UGU	589
AD-1479529.1	asusuugcuaUfGfUfua gacgauguL96	349	asdCsaudCg(U2p)cuaadCaUf adGcaaauscsu	967	AGAUUUGCUAUGUUAGACGA UGU	589
AD-1479530.1	asusuugcuaUfGfUfua gacgaugaL96	820	usdCsaudCg(Tgn)cuaadCaUf adGcaaauscsu	968	AGAUUUGCUAUGUUAGACGA UGU	589
AD-1479531.1	asusuugcuaUfGfUfua gacgaugaL96	820	usdCsaudCg(U2p)cuaadCaUf adGcaaauscsu	969	AGAUUUGCUAUGUUAGACGA UGU	589
AD-1479532.1	asusuugcuaUfGfUfua gacgaugaL96	820	usdCsaudCg(Tgn)cuaadCaUf agcaaauscsu	970	AGAUUUGCUAUGUUAGACGA UGU	589
AD-1479533.1	asusuugcuaUfGfUfua gacgaugaL96	820	usdCsaudCg(U2p)cuaadCaUf agcaaauscsu	971	AGAUUUGCUAUGUUAGACGA UGU	589
AD-1479534.1	ususgcuaUfGfUfuagac gauguL96	821	asdCsaudCg(Tgn)cuaadCaUf adGcaasgsu	972	AUUUGCUAUGUUAGACGAUG U	26
AD-1479535.1	ususgcuaUfGfUfuagac gauguL96	821	asdCsaudCg(U2p)cuaadCaUf adGcaasgsu	973	AUUUGCUAUGUUAGACGAUG U	26
AD-1479536.1	asusuuccuaUfGfUfuag acgauguL96	822	asdCsaudCg(U2p)cuaadCaUf adGgaaauscsu	974	AGAUUUGCUAUGUUAGACGA UGU	589

AD- 1479537.1	asusuagcuaUfGfUfuag acgauguL96	823	asdCsaudCg(U2p)cuaadCaUf adGcuaauscsu	975	AGAUUUGC UAUGUUAGACGA UGU	589
AD- 1479538.1	asusaugcuaUfGfUfuag acgauguL96	824	asdCsaudCg(U2p)cuaadCaUf adGcau auscsu	976	AGAUUUGC UAUGUUAGACGA UGU	589

Таблица 9: Скрининг дозы для ANGPTL3 в первичных гепатоцитах яванской макаки (PCH)

Дуплекс	10 нМ		1 нМ		0,1 нМ	
	Средний % оставшейся мРНК	STDEV	Средний % оставшейся мРНК	STDEV	Средний % оставшейся мРНК	STDEV
AD-1331203.3	21,83	3,88	37,26	10,35	63,40	6,85
AD-1331206.3	26,97	6,93	36,84	0,72	63,76	8,49
AD-1331209.3	29,11	6,54	47,11	9,54	69,87	10,35
AD-1331212.3	20,51	1,87	32,34	3,79	64,22	4,01
AD-1331213.3	24,52	6,06	54,62	13,41	79,48	4,89
AD-1331240.3	23,28	2,48	39,36	12,24	61,69	2,10
AD-1331262.3	21,78	4,54	36,65	10,43	34,32	6,45
AD-1331264.3	30,25	4,78	42,15	9,57	73,71	7,94
AD-1331265.3	15,48	6,76	23,56	9,61	58,07	11,35
AD-1331266.3	22,04	6,40	37,66	7,86	76,54	13,10
AD-1331329.3	27,51	4,89	48,91	13,92	80,66	18,31
AD-1479370.1	21,73	4,33	30,33	5,56	48,74	4,38
AD-1479371.1	31,70	5,00	45,03	9,50	75,21	6,98
AD-1479372.1	24,67	4,69	31,62	5,49	48,74	11,67
AD-1479373.1	24,70	5,31	42,70	11,47	55,73	7,91
AD-1479374.1	20,99	5,74	39,52	8,56	53,59	9,84
AD-1479375.1	34,71	4,39	42,32	8,36	68,22	7,34
AD-1479376.1	27,40	3,28	39,83	8,85	75,37	7,01
AD-1479377.1	23,02	6,24	28,41	4,55	46,53	3,65
AD-1479378.1	19,86	2,91	35,90	5,17	65,17	6,57
AD-1479379.1	40,95	9,09	45,69	7,59	91,98	9,04
AD-1479380.1	33,08	3,69	41,27	4,32	77,14	6,74
AD-1479381.1	59,79	5,80	58,68	11,10	97,26	18,01
AD-1479382.1	54,83	6,34	69,58	12,85	106,90	10,18
AD-1479383.1	26,82	7,80	39,42	5,78	66,74	13,93
AD-1479384.1	31,41	9,09	42,81	8,93	77,27	6,47
AD-1479385.1	23,53	2,60	42,30	6,40	63,42	5,36

AD-1479386.1	58,87	11,25	63,77	6,47	82,82	7,42
AD-1479387.1	28,69	6,25	40,57	7,31	66,99	5,01
AD-1479388.1	44,77	1,46	71,86	11,05	102,85	5,40
AD-1479389.1	33,00	3,97	59,97	7,53	76,18	7,92
AD-1479390.1	63,21	14,55	94,18	30,48	110,96	4,78
AD-1479391.1	19,40	2,17	32,29	10,49	48,57	6,14
AD-1479392.1	61,28	6,41	77,43	17,86	100,18	14,53
AD-1479393.1	96,38	5,44	123,77	19,35	131,27	5,92
AD-1479394.1	75,77	11,27	84,31	5,24	125,94	10,43
AD-1479395.1	84,00	3,40	110,51	15,20	135,40	22,27
AD-1479396.1	20,02	5,37	32,81	7,36	56,85	11,34
AD-1479397.1	13,38	2,73	26,07	1,29	42,37	9,09
AD-1479398.1	18,15	3,78	37,73	7,00	51,52	7,54
AD-1479399.1	26,26	3,82	66,97	14,01	76,11	13,57
AD-1479400.1	26,46	3,84	50,16	7,83	77,00	16,24
AD-1479401.1	14,67	3,25	36,91	7,56	60,75	9,50
AD-1479402.1	18,55	2,16	40,23	6,63	65,32	9,53
AD-1479403.1	18,00	1,15	38,70	3,77	58,14	12,26
AD-1479404.1	21,38	2,80	29,69	4,16	56,93	14,45
AD-1479405.1	15,85	4,03	28,15	5,44	44,64	8,56
AD-1479406.1	16,92	0,29	36,24	5,32	53,50	2,57
AD-1479407.1	23,54	1,76	21,01	4,97	56,23	8,47
AD-1479408.1	21,03	1,82	30,88	6,36	56,85	6,10
AD-1479409.1	22,92	3,73	44,89	5,55	68,09	6,93
AD-1479410.1	18,25	4,82	39,37	4,09	61,13	10,17
AD-1479411.1	14,08	2,22	42,44	1,98	47,58	10,60
AD-1479412.1	36,87	5,55	42,48	3,19	81,01	5,10
AD-1479413.1	36,52	7,54	37,35	7,69	64,91	4,50
AD-1479414.1	23,48	2,64	45,97	10,29	60,47	1,44
AD-1479415.1	25,78	3,27	42,28	8,67	67,23	8,22
AD-1479416.1	32,26	0,81	52,88	3,11	85,61	9,71
AD-1479417.1	25,89	4,12	57,24	10,15	73,76	12,58
AD-1479418.1	50,84	5,51	84,77	11,67	86,23	9,86
AD-1479419.1	81,24	13,71	86,77	18,63	109,03	3,82

AD-1479420.1	33,82	4,30	48,85	7,44	55,89	4,72
AD-1479421.1	27,81	2,72	55,22	13,15	71,11	7,85
AD-1479422.1	24,35	3,45	46,73	12,34	72,10	8,19
AD-1479423.1	38,85	8,70	69,75	11,36	94,64	10,27
AD-1479424.1	60,95	9,16	84,22	24,95	100,52	8,74
AD-1479425.1	49,93	5,03	81,50	3,59	106,39	17,05
AD-1479426.1	64,96	3,02	107,97	24,24	111,97	10,08
AD-1479427.1	53,66	9,36	49,75	1,44	83,24	4,12
AD-1479428.1	54,54	13,38	61,03	10,13	95,32	5,55
AD-1479429.1	28,06	0,11	34,65	13,04	68,26	6,60
AD-1479430.1	41,79	7,33	34,04	2,47	85,11	12,69
AD-1479431.1	41,03	5,73	40,66	14,93	79,67	8,18
AD-1479432.1	24,77	2,72	39,12	12,26	62,46	10,43
AD-1479433.1	22,76	4,25	39,21	7,40	55,17	1,73
AD-1479434.1	22,41	3,01	30,94	4,88	67,71	2,90
AD-1479435.1	46,22	2,94	37,66	6,83	70,31	12,03
AD-1479436.1	53,57	9,68	66,50	11,98	93,07	6,61
AD-1479437.1	30,05	2,19	31,48	7,94	81,65	10,22
AD-1479438.1	32,45	5,46	31,69	8,74	80,44	7,35
AD-1479439.1	31,32	4,75	42,83	8,67	75,05	12,99
AD-1479440.1	24,78	3,63	34,04	6,04	59,37	4,97
AD-1479441.1	19,12	1,68	24,28	6,41	56,31	11,28
AD-1479442.1	32,17	3,43	38,40	4,55	64,80	4,34
AD-1479443.1	30,40	1,97	41,56	10,74	78,97	13,24
AD-1479444.1	53,81	9,16	69,98	18,91	99,85	14,28
AD-1479445.1	35,46	6,89	45,54	8,33	71,44	7,16
AD-1479446.1	31,98	4,88	22,01	3,01	61,20	13,17
AD-1479447.1	24,59	1,80	21,52	2,02	59,10	3,71
AD-1479448.1	20,40	1,50	32,92	4,93	60,39	9,30
AD-1479449.1	38,49	4,54	34,93	4,00	73,51	6,96
AD-1479450.1	30,67	5,77	28,39	3,06	65,84	4,88
AD-1479451.1	32,03	1,24	54,77	8,19	66,14	6,03
AD-1479452.1	47,19	8,86	70,69	2,08	86,72	21,00
AD-1479453.1	62,14	2,67	67,53	3,34	113,26	3,76

AD-1479454.1	109,81	13,06	93,99	2,92	58,69	2,73
AD-1479455.1	32,58	10,08	39,20	10,59	42,16	4,54
AD-1479456.1	34,33	2,41	38,06	8,00	45,02	8,84
AD-1479457.1	26,03	8,91	33,26	9,15	51,76	4,91
AD-1479458.1	38,72	5,70	61,21	7,99	72,12	10,10
AD-1479459.1	31,06	2,30	46,84	10,36	64,49	8,60
AD-1479460.1	36,10	0,53	38,93	11,60	46,56	9,61
AD-1479461.1	49,69	14,23	64,11	10,16	64,82	10,62
AD-1479462.1	38,10	4,32	53,00	5,77	51,24	8,83
AD-1479463.1	29,29	3,76	41,94	8,30	61,26	10,42
AD-1479464.1	48,97	4,76	66,96	17,46	109,86	17,74
AD-1479465.1	98,84	16,78	105,30	11,34	113,42	18,73
AD-1479466.1	39,24	7,52	67,82	6,21	106,86	10,90
AD-1479467.1	65,56	13,36	89,24	24,01	128,50	14,14
AD-1479468.1	36,93	5,50	52,51	18,31	69,18	9,94
AD-1479469.1	57,21	6,51	86,69	11,17	69,71	10,74
AD-1479470.1	86,09	12,11	88,91	15,03	96,18	15,66
AD-1479471.1	64,25	8,99	70,62	9,85	119,81	12,25
AD-1479472.1	42,02	5,71	69,00	7,98	102,53	23,14
AD-1479473.1	24,01	6,34	60,89	3,70	79,05	6,27
AD-1479474.1	13,49	2,03	28,93	9,44	35,40	5,48
AD-1479475.1	20,47	1,73	42,26	8,24	30,02	8,45
AD-1479476.1	18,07	6,80	37,75	14,77	42,84	8,79
AD-1479477.1	27,36	6,67	54,67	11,39	79,19	18,42
AD-1479478.1	28,06	7,96	32,84	6,87	83,29	17,40
AD-1479479.1	26,54	6,18	48,54	10,73	83,40	6,36
AD-1479480.1	23,79	4,31	40,17	13,79	79,79	14,19
AD-1479481.1	19,44	4,33	34,39	10,89	39,32	7,47
AD-1479482.1	20,96	1,55	41,32	11,54	29,05	1,65
AD-1479483.1	21,13	3,90	38,58	7,09	48,12	8,51
AD-1479484.1	26,29	5,13	46,10	12,66	55,17	8,09
AD-1479485.1	36,56	8,06	47,42	4,42	68,70	5,47
AD-1479486.1	26,10	8,69	47,98	4,74	91,73	17,12
AD-1479487.1	27,49	7,14	57,39	4,76	83,07	12,31

AD-1479488.1	12,46	3,09	22,12	2,70	65,46	13,64
AD-1479489.1	23,50	4,20	43,78	3,19	26,93	2,48
AD-1479490.1	24,91	4,58	36,16	2,50	38,67	8,14
AD-1479491.1	17,96	0,44	37,69	7,51	52,46	14,94
AD-1479492.1	17,16	5,40	23,26	3,68	53,32	11,48
AD-1479493.1	39,85	5,04	43,16	14,17	103,09	8,75
AD-1479494.1	24,55	10,40	44,63	6,21	64,10	7,84
AD-1479495.1	26,79	9,37	45,44	7,49	68,61	12,47
AD-1479496.1	37,70	5,80	79,45	5,42	52,05	2,04
AD-1479497.1	19,94	2,51	55,28	9,15	67,55	13,60
AD-1479498.1	23,47	7,35	38,30	6,65	75,40	9,32
AD-1479499.1	22,56	4,30	50,37	6,18	103,58	26,12
AD-1479500.1	36,43	8,14	42,46	19,64	112,00	12,08
AD-1479501.1	19,57	5,58	39,48	13,76	65,35	5,54
AD-1479502.1	21,52	7,06	40,25	10,08	82,14	3,92
AD-1479503.1	25,61	4,21	35,97	9,20	42,53	6,68
AD-1479504.1	44,17	3,59	85,62	11,11	74,61	20,24
AD-1479505.1	35,41	6,70	67,31	11,33	90,56	25,07
AD-1479506.1	40,57	4,91	75,46	3,63	77,84	13,98
AD-1479507.1	36,24	1,16	57,87	11,93	90,58	15,11
AD-1479508.1	26,26	1,96	41,71	3,04	87,84	20,80
AD-1479509.1	36,83	3,05	61,90	4,66	98,42	19,40
AD-1479510.1	34,79	2,17	45,38	10,17	82,24	10,05
AD-1479511.1	35,10	6,24	49,37	11,18	37,46	9,73
AD-1479512.1	25,99	5,51	54,32	6,33	53,60	13,57
AD-1479513.1	21,56	6,48	25,88	15,98	73,48	16,15
AD-1479514.1	19,43	6,82	44,34	10,63	64,34	8,45
AD-1479515.1	25,18	8,67	39,57	16,86	85,87	8,35
AD-1479516.1	38,16	5,84	53,95	7,12	96,45	9,65
AD-1479517.1	39,56	10,21	51,49	8,41	59,11	9,25
AD-1479518.1	33,94	7,42	53,59	12,98	31,54	2,94
AD-1479519.1	43,12	8,26	63,00	10,67	64,42	9,27
AD-1479520.1	22,82	6,08	41,72	16,75	80,11	19,91
AD-1479521.1	26,02	2,29	48,99	9,22	91,48	14,66

AD-1479522.1	43,26	6,15	61,44	16,38	79,92	15,83
AD-1479523.1	44,07	3,24	66,18	5,97	103,15	9,97
AD-1479524.1	63,42	9,40	76,50	13,58	93,92	20,94
AD-1479525.1	61,13	7,14	74,69	10,00	55,51	5,76
AD-1479526.1	45,18	6,46	66,41	9,41	56,67	4,28
AD-1479527.1	39,53	5,39	55,03	9,70	55,04	2,46
AD-1479528.1	42,61	14,62	63,30	6,12	89,09	17,17
AD-1479529.1	40,15	6,52	55,13	6,97	91,58	18,95
AD-1479530.1	43,63	1,77	55,22	5,79	91,83	11,83
AD-1479531.1	35,71	4,54	43,24	7,42	64,00	12,70
AD-1479532.1	37,43	7,12	44,99	3,16	51,75	4,05
AD-1479533.1	31,71	5,48	49,18	5,98	54,17	7,90
AD-1479534.1	75,18	5,91	80,12	9,23	69,93	6,07
AD-1479535.1	43,87	2,79	53,58	7,92	44,33	9,04
AD-1479536.1	56,99	11,10	67,52	13,00	76,03	17,66
AD-1479537.1	43,81	2,50	57,35	9,20	71,02	15,35
AD-1479538.1	35,44	1,57	51,51	6,24	72,09	11,75

Таблица 10: Скрининг дозы для ANGPTL3 в клетках НерЗВ

Дуплекс	10 нМ		1 нМ		0,1 нМ	
	Средний % оставшейся мРНК	STDEV	Средний % оставшейся мРНК	STDEV	Средний % оставшейся мРНК	STDEV
AD-1331203.3	2,56	1,05	5,78	1,82	10,71	1,51
AD-1331206.3	1,59	0,49	3,68	1,19	19,15	7,31
AD-1331209.3	1,89	1,43	2,94	0,99	10,29	3,96
AD-1331212.3	0,82	0,21	2,92	1,20	12,51	3,50
AD-1331213.3	0,97	0,25	3,01	1,07	4,87	1,01
AD-1331240.3	2,30	0,82	2,72	1,01	9,26	2,42
AD-1331262.3	1,68	0,65	2,74	1,49	6,89	2,53
AD-1331264.3	1,26	0,68	2,09	0,53	4,45	0,98
AD-1331265.3	1,22	0,69	1,39	0,24	4,62	0,78
AD-1331266.3	1,45	0,45	2,81	1,69	8,40	3,51
AD-1331329.3	1,87	0,47	3,71	0,62	9,98	3,76

AD-1479370.1	0,70	0,26	1,70	0,37	6,01	2,25
AD-1479371.1	1,24	0,34	3,32	0,89	8,65	2,31
AD-1479372.1	0,74	0,32	2,21	0,66	7,22	1,47
AD-1479373.1	1,62	0,72	3,18	1,07	8,00	3,21
AD-1479374.1	0,82	0,55	1,90	0,84	3,94	1,09
AD-1479375.1	1,23	0,43	2,97	0,94	6,46	2,32
AD-1479376.1	0,71	0,47	0,98	0,40	1,63	0,98
AD-1479377.1	1,27	0,28	3,78	0,97	13,89	3,72
AD-1479378.1	1,27	0,25	3,99	1,54	5,86	0,67
AD-1479379.1	2,66	0,73	9,10	4,04	20,53	3,84
AD-1479380.1	1,87	0,74	7,68	4,32	20,84	7,70
AD-1479381.1	4,42	0,26	16,16	3,26	36,78	6,88
AD-1479382.1	4,57	0,62	13,52	5,37	32,46	5,88
AD-1479383.1	0,84	0,31	2,35	0,81	1,67	1,12
AD-1479384.1	1,93	0,64	5,83	2,83	14,73	4,19
AD-1479385.1	1,08	0,37	4,13	1,65	6,43	2,09
AD-1479386.1	2,83	0,83	8,74	4,58	19,64	9,39
AD-1479387.1	1,10	0,14	4,44	1,43	6,84	4,38
AD-1479388.1	2,99	0,86	10,08	3,07	29,02	7,17
AD-1479389.1	1,54	0,11	4,33	1,51	8,33	5,53
AD-1479390.1	10,13	3,41	16,53	6,45	23,79	9,14
AD-1479391.1	1,17	0,38	3,09	1,06	10,15	3,02
AD-1479392.1	7,63	1,83	31,21	15,94	57,54	10,66
AD-1479393.1	52,13	15,03	69,88	13,74	91,32	19,61
AD-1479394.1	9,00	2,71	22,63	2,67	51,95	6,90
AD-1479395.1	40,22	7,66	52,41	18,64	96,34	3,49
AD-1479396.1	1,07	0,46	1,70	1,35	6,63	6,58
AD-1479397.1	0,86	0,36	3,53	1,18	5,91	1,45
AD-1479398.1	1,50	0,90	6,42	3,46	10,99	3,66
AD-1479399.1	3,54	0,92	8,49	2,78	27,55	7,38
AD-1479400.1	1,11	0,24	3,20	0,78	12,77	7,00
AD-1479401.1	1,95	0,33	4,82	1,58	13,65	4,06
AD-1479402.1	1,34	0,38	3,79	0,76	5,90	2,65
AD-1479403.1	1,52	0,34	3,81	2,15	8,67	3,83

AD-1479404.1	1,39	0,75	2,32	1,87	5,86	2,43
AD-1479405.1	1,34	0,06	4,79	1,59	10,28	2,81
AD-1479406.1	1,23	0,43	7,02	3,49	14,07	1,53
AD-1479407.1	1,16	0,10	3,91	1,77	10,39	3,52
AD-1479408.1	1,49	0,35	4,94	0,91	11,23	2,72
AD-1479409.1	1,99	0,80	4,21	0,91	9,22	3,17
AD-1479410.1	1,42	0,58	3,36	1,67	9,71	0,44
AD-1479411.1	1,35	0,56	2,50	0,93	7,70	3,21
AD-1479412.1	3,89	2,46	13,62	4,70	28,28	8,42
AD-1479413.1	1,62	0,66	7,37	3,37	19,00	8,01
AD-1479414.1	1,40	0,28	4,70	2,02	9,41	5,26
AD-1479415.1	2,41	1,04	4,57	2,30	13,68	5,43
AD-1479416.1	2,20	0,48	4,53	2,94	24,63	9,63
AD-1479417.1	2,25	1,02	3,34	0,57	7,95	3,77
AD-1479418.1	39,69	14,09	45,94	2,87	48,92	7,24
AD-1479419.1	75,56	19,77	79,76	10,85	110,17	27,25
AD-1479420.1	2,52	1,06	8,41	3,93	18,16	10,80
AD-1479421.1	2,74	0,57	5,73	2,36	15,54	5,49
AD-1479422.1	2,10	0,48	5,58	2,03	18,31	3,85
AD-1479423.1	3,82	2,55	7,74	3,06	25,71	11,02
AD-1479424.1	4,02	1,23	9,16	2,94	37,90	13,00
AD-1479425.1	2,85	0,89	7,17	3,66	25,10	6,27
AD-1479426.1	55,96	15,59	61,93	8,78	49,65	5,04
AD-1479427.1	10,33	3,51	22,90	9,60	49,16	20,17
AD-1479428.1	9,77	2,51	25,64	11,07	56,36	12,52
AD-1479429.1	1,49	0,59	3,54	1,79	12,59	5,62
AD-1479430.1	1,62	0,43	4,61	1,88	9,64	4,08
AD-1479431.1	1,35	0,44	2,44	0,54	8,11	2,77
AD-1479432.1	1,62	0,72	2,38	1,34	6,91	2,49
AD-1479433.1	0,99	0,21	1,94	0,86	7,22	1,09
AD-1479434.1	0,90	0,25	5,97	2,64	12,11	5,31
AD-1479435.1	1,73	0,73	6,13	3,34	14,69	4,81
AD-1479436.1	1,05	0,20	3,67	0,65	11,24	2,31
AD-1479437.1	0,95	0,27	2,17	0,44	4,90	1,31

AD-1479438.1	1,42	0,49	1,92	0,28	6,34	1,69
AD-1479439.1	2,21	1,72	2,95	1,13	10,06	5,02
AD-1479440.1	0,97	0,44	4,16	2,40	5,58	2,58
AD-1479441.1	1,43	0,24	5,17	2,44	10,85	5,96
AD-1479442.1	1,71	0,82	7,03	2,96	15,78	1,59
AD-1479443.1	1,99	0,15	4,20	1,76	15,11	6,13
AD-1479444.1	3,76	2,20	9,85	1,92	33,56	2,89
AD-1479445.1	1,33	0,41	3,61	0,56	9,38	3,59
AD-1479446.1	0,83	0,13	2,52	0,88	5,05	3,97
AD-1479447.1	0,65	0,24	2,33	1,08	6,13	3,55
AD-1479448.1	1,00	0,37	2,35	0,92	3,72	2,25
AD-1479449.1	1,50	0,31	10,17	1,89	18,74	1,57
AD-1479450.1	1,21	0,36	5,21	2,18	10,41	5,80
AD-1479451.1	0,66	0,12	3,73	1,58	13,22	3,90
AD-1479452.1	2,08	0,55	9,13	2,38	22,72	0,97
AD-1479453.1	15,54	5,16	32,78	10,94	71,93	22,57
AD-1479454.1	65,02	10,00	91,33	19,38	90,24	26,68
AD-1479455.1	1,57	0,66	2,83	0,87	7,39	1,03
AD-1479456.1	2,22	0,41	2,75	0,92	6,08	2,03
AD-1479457.1	1,72	0,69	2,71	0,39	4,41	1,23
AD-1479458.1	1,95	0,95	2,25	0,58	9,40	1,30
AD-1479459.1	1,44	0,47	2,75	1,38	7,52	3,58
AD-1479460.1	1,25	0,79	1,62	0,62	3,19	1,13
AD-1479461.1	15,71	6,42	40,90	1,81	70,79	13,15
AD-1479462.1	2,69	0,63	5,07	1,15	14,25	1,23
AD-1479463.1	1,93	0,40	3,44	0,69	13,10	4,65
AD-1479464.1	21,21	2,94	37,83	9,54	55,70	10,96
AD-1479465.1	94,02	21,46	89,76	13,33	84,42	8,02
AD-1479466.1	2,97	0,43	5,33	0,78	20,98	3,01
AD-1479467.1	34,59	8,40	56,36	9,71	65,42	7,49
AD-1479468.1	3,55	1,69	6,16	2,61	23,62	6,69
AD-1479469.1	7,19	2,25	31,75	8,89	59,45	14,83
AD-1479470.1	34,57	7,26	71,66	16,04	77,20	20,04
AD-1479471.1	19,71	6,12	42,15	7,03	62,85	10,38

AD-1479472.1	3,25	0,90	8,58	1,59	22,27	2,50
AD-1479473.1	1,94	0,35	2,95	0,97	7,67	2,15
AD-1479474.1	0,72	0,16	0,91	0,41	1,81	0,86
AD-1479475.1	1,03	0,29	1,51	0,75	6,54	1,76
AD-1479476.1	1,69	0,23	2,37	0,53	6,27	1,89
AD-1479477.1	2,10	0,47	4,60	1,46	8,94	2,45
AD-1479478.1	1,41	0,53	2,68	0,61	5,84	1,48
AD-1479479.1	1,23	0,26	1,92	1,14	4,62	0,98
AD-1479480.1	1,13	0,18	1,77	0,21	5,83	0,97
AD-1479481.1	0,71	0,20	1,14	0,53	2,83	0,33
AD-1479482.1	1,17	0,57	1,42	0,61	4,95	3,07
AD-1479483.1	1,59	0,19	2,93	0,55	6,52	2,36
AD-1479484.1	1,95	0,62	5,28	0,79	16,09	4,36
AD-1479485.1	10,21	3,88	24,41	3,03	46,43	8,45
AD-1479486.1	1,26	0,18	3,37	1,25	9,94	2,95
AD-1479487.1	1,24	0,41	2,37	0,59	6,36	0,97
AD-1479488.1	0,94	0,36	1,17	0,17	2,68	0,88
AD-1479489.1	1,24	0,48	4,32	2,08	8,54	1,70
AD-1479490.1	1,48	0,43	3,10	1,01	12,12	3,82
AD-1479491.1	2,94	0,42	8,38	1,49	16,68	0,57
AD-1479492.1	2,73	0,80	5,36	2,91	16,03	2,29
AD-1479493.1	2,21	0,39	7,03	1,87	21,40	3,70
AD-1479494.1	2,24	0,67	5,00	1,88	17,67	5,78
AD-1479495.1	1,15	0,26	2,50	1,01	11,45	2,94
AD-1479496.1	3,36	1,10	9,57	2,48	21,08	7,08
AD-1479497.1	1,81	0,10	4,07	2,09	14,57	6,34
AD-1479498.1	2,36	0,60	3,43	1,71	12,93	4,00
AD-1479499.1	1,44	0,31	3,14	1,38	8,29	1,30
AD-1479500.1	2,29	0,42	5,32	2,50	17,09	5,09
AD-1479501.1	1,53	0,34	2,65	0,72	10,66	2,02
AD-1479502.1	1,11	0,23	3,36	1,32	10,09	3,35
AD-1479503.1	1,14	0,79	1,38	0,84	3,36	2,03
AD-1479504.1	2,25	0,35	8,68	2,33	21,53	8,29
AD-1479505.1	1,71	0,54	4,90	2,53	10,14	3,64

AD-1479506.1	2,09	0,75	4,57	1,13	12,90	1,93
AD-1479507.1	4,54	0,69	13,63	2,25	33,97	4,86
AD-1479508.1	1,82	0,53	6,13	0,67	23,73	4,03
AD-1479509.1	4,80	1,98	8,33	0,80	29,49	14,92
AD-1479510.1	0,58	0,21	1,25	0,52	3,52	0,80
AD-1479511.1	1,36	0,36	3,50	2,20	9,28	2,77
AD-1479512.1	1,11	0,44	2,19	0,76	6,64	2,72
AD-1479513.1	3,46	0,90	7,66	2,66	20,30	8,67
AD-1479514.1	1,35	0,42	2,47	1,68	5,16	2,20
AD-1479515.1	11,22	1,44	36,27	10,10	57,69	8,34
AD-1479516.1	2,03	0,53	4,16	0,78	17,23	8,59
AD-1479517.1	1,80	0,62	3,09	1,42	11,87	2,55
AD-1479518.1	0,76	0,24	2,07	0,76	4,62	1,33
AD-1479519.1	8,53	1,62	17,79	1,36	56,60	18,23
AD-1479520.1	2,94	0,56	4,64	2,17	15,83	5,06
AD-1479521.1	1,67	0,50	4,71	1,84	12,38	5,24
AD-1479522.1	6,66	2,45	19,95	1,02	42,74	9,16
AD-1479523.1	1,45	0,27	2,25	0,82	5,24	1,59
AD-1479524.1	3,72	1,08	5,93	2,08	24,05	11,86
AD-1479525.1	1,49	0,65	7,18	2,11	18,32	7,26
AD-1479526.1	2,83	0,37	6,65	1,60	21,57	10,68
AD-1479527.1	2,15	0,29	5,42	0,58	13,22	3,12
AD-1479528.1	1,50	0,31	4,55	0,92	11,97	0,58
AD-1479529.1	4,69	5,91	3,30	1,22	6,02	1,83
AD-1479530.1	1,82	0,62	3,38	1,07	9,22	1,73
AD-1479531.1	1,07	0,33	1,21	0,88	3,29	1,85
AD-1479532.1	1,03	0,14	2,26	1,22	8,37	2,27
AD-1479533.1	0,78	0,11	1,87	0,38	3,90	1,94
AD-1479534.1	3,57	1,37	5,74	1,72	19,59	8,15
AD-1479535.1	1,43	0,36	2,32	0,56	5,13	1,48
AD-1479536.1	1,40	0,38	4,19	0,79	11,84	0,61
AD-1479537.1	1,11	0,34	2,44	0,79	6,02	1,66
AD-1479538.1	0,75	0,11	1,46	0,32	4,69	1,79

Пример 5: Скрининг дуплексов дцРНК у мышей *in vivo*

Дуплексы, представляющие интерес, идентифицированные в упомянутых выше исследованиях *in vitro*, оценивали *in vivo*. В частности, мышей трансдуцировали ААВ, содержащим hANGPTL3 (полноразмерный ген человека), при 2×10^{11} вирусных частиц на мышь. Через четыре недели после трансдукции мышам подкожно вводили однократную дозу 3 мг/кг представляющего интерес дуплекса. В Дни 7 и 14 после введения дозы собирали сыворотки крови и определяли уровень белка hANGPTL3 с помощью ИФА (R&D Systems hANPTL3 ИФА, DANL30). Результаты этих анализов представлены в Таблице 11 ниже. В среднем использовали трех мышей на временную точку, и процентное содержание белка hANGPTL3 в сравнении с образцами, обработанными контрольным ФСБ, на День 7 и День 14 представлено в Таблице 11.

Таблица 11: Скрининг дцРНК против ANGPTL3 *in vivo*

	Среднее значение по сравнению с контрольным ФСБ День 7	Среднее значение по сравнению с контрольным ФСБ День 14
ФСБ	100	100
Наивные	99,77	69,34
AD-1331203.2	44,24	33,25
AD-1331206.2	15,05	7,72
AD-1331209.2	19,34	17,56
AD-1331212.2	11,85	17,54
AD-1331213.2	14,41	18,03
AD-1331329.2	29,39	30,07
AD-1331237.2	30,52	46,84
AD-1331238.2	31,11	66,36
AD-1331240.2	17,48	36,42
AD-1331244.2	22,35	75,83
AD-1331256.2	43,7	33,75
AD-1331262.2	30,91	47,3
AD-1331264.2	18,46	36,5
AD-1331265.2	15,2	48,17
AD-1331266.2	24,28	33,19
AD-1331316.2	56,1	58,06
AD-1331338.2	36,89	57,43
AD-74757.13	14,5	18,42

Пример 6: Анализ SAR отобранных дуплексов дцРНК *in vivo*

Анализы зависимости активности от структуры (SAR) также оценивали *in vivo* подобно тому, как описано выше. В общих чертах, мышей трансдуцировали ААВ, содержащим hANGPTL3, при 2×10^{11} вирусных частиц на мышь. Через две недели после трансдукции мышам подкожно вводили представляющие интерес дуплексы, и сыворотки крови собирали в День 0 (день введения дозы), День 7, День 14 и День 28. Уровни белка hANGPTL3 определяли с помощью ИФА, как описано выше. Результаты, представленные в виде среднего процента по сравнению с Днем 0, показаны в Таблице 12 и Таблице 13.

Таблица 12: Зависимость активности от структуры (SAR) дцРНК против ANGPTL3 *in vivo* - результаты на День 7 и 14

Обработка	Исходный	Среднее процентное изменение День 7	Среднее процентное изменение День 14
ФСБ	н/п	152,8	151,2
Наивные	н/п	147,2	77,2
AD-1331212.4	исходный	16,3	5,9
AD-1479372.2	AD-1331212.4	18	8,3
AD-1479374.2	AD-1331212.4	23,4	15,3
AD-1479378.2	AD-1331212.4	31,5	36,2
AD-1331213.4	исходный	22,1	16,6
AD-1479385.2	AD-1331213.4	21,7	33,3
AD-1479391.2	AD-1331213.4	59,1	50
AD-1479397.2	AD-1331264	31,5	39,2
AD-1331206.4	исходный	13,4	11,4
AD-1479440.2	AD-1331206.4	30,1	50,7
AD-1479460.2	AD-1331240	92,9	131,5
AD-1479481.2	AD-1331265	21,2	44,1
AD-1479482.2	AD-1331265	63,2	58,9
AD-1479489.2	AD-1331262	21,2	30,7
AD-1479511.2	AD-1331266	51,5	128,6
AD-1479533.2	AD-1331329	22,8	24,3
AD-74757.14	Эталон	62,3	49,6

Таблица 13: Зависимость активности от структуры (SAR) кцРНК против ANGPTL3 *in vivo* - результаты на День 28

Обработка	Исходный	Среднее процентное изменение День 28	STDEV День 28
ФСБ	н/п	58,8	4,3
Наивные	н/п	66,7	
AD-1331212.4	исходный	7,5	2,7
AD-1479372.2	AD-1331212.4	22,2	2,1
AD-1479374.2	AD-1331212.4	26,2	7,3
AD-1479378.2	AD-1331212.4	51,2	15,1
AD-1331213.4	исходный	14	2,3
AD-1479385.2	AD-1331213.4	59	14
AD-1479391.2	AD-1331213.4	77,3	
AD-1479397.2	AD-1331264	56,2	21,3
AD-1331206.4	исходный	20,2	3,2
AD-1479440.2	AD-1331206.4	71,2	6,4
AD-1479460.2	AD-1331240	80,1	24,7
AD-1479481.2	AD-1331265	44,3	11,6
AD-1479482.2	AD-1331265	71,6	18,4
AD-1479489.2	AD-1331262	119,6	
AD-1479511.2	AD-1331266	90,5	22,1
AD-1479533.2	AD-1331329	24,4	8,4
AD-74757.14	Эталон	16,7	11,4

Пример 7: Эффекты конъюгатов кiPHK-GalNAC в исследованиях на приматах, отличных от человека

Эффективность ведущих кандидатов из описанных выше исследований *in vivo*, AD-1331212, AD-1331213 и AD-1479372, дополнительно исследовали у приматов, отличных от человека. В частности, однократную дозу 3 мг/кг или 10 мг/кг AD-1331212, AD-1331213 и AD-1479372 вводили подкожно яванским макакам. У животных каждую неделю собирали сыворотки крови, и уровень белка ANGPTL3 в сыворотке крови определяли с помощью ИФА. Результаты, представленные в виде процентного изменения ANGPTL3 по сравнению с уровнем в день введения дозы (День 0), показаны на Фигуре 3.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Специалисты в данной области техники поймут многие эквиваленты конкретных вариантов реализации и способов, описанных в настоящем документе, или будут способны установить такие эквиваленты с использованием только лишь обычных экспериментов.

Предполагается, что такие эквиваленты охвачены объемом следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии ангиопоэтин-подобного 3 (ANGPTL3) в клетке, где указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, причем указанная антисмысловая цепь содержит область комплементарности мРНК, кодирующей ANGPTL3, и при этом указанная область комплементарности содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 2-3 и 7-8.

2. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии ангиопоэтин-подобного 3 (ANGPTL3) в клетке, где указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 58-80, 73-102, 73-124, 80-114, 291-320, 291-342, 307-336, 540-567, 540-589 и 545-577 SEQ ID NO: 1, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

3. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии ангиопоэтин-подобного 3 (ANGPTL3) в клетке, где указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 58-80, 80-102; 84-106; 87-109; 91-113; 92-114; 186-208; 307-329; 308-330; 310-332; 314-336; 545-567; 551-573; 553-575; 554-576; 555-577; 1133-1155; или 1140-1162 SEQ ID NO: 1, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

4. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии ангиопоэтин-подобного 3 (ANGPTL3) в клетке, где указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 58-80, 91-113 или 92-114 SEQ ID NO: 1, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

5. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии ангиопоэтин-подобного 3 (ANGPTL3) в клетке, где указанный

агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 58-80 SEQ ID NO: 1, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

6. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1331203.1; AD-1331206.1; AD-1331209.1; AD-1331212.1; AD-1331213.1; AD-1331329.1; AD-1331237.1; AD-1331238.1; AD-1331240.1; AD-1331244.1; AD-1331256.1; AD-1331262.1; AD-1331264.1; AD-1331265.1; AD-1331266.1; AD-1331316.1; AD-1331338.1; и AD-1479372.

7. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1331203.1; AD-1331206.1; AD-1331209.1; AD-1331212.1; AD-1331213.1; AD-1331329.1; AD-1331240.1; AD-1331262.1; AD-1331264.1; AD-1331265.1 AD-1331266.1; и AD-1479372.

8. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1331203.1; AD-1331206.1; AD-1331209.1; AD-1331212.1; AD-1331213.1; и AD-1479372.

9. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1331212.1; AD-1331213.1; и AD-1479372.

10. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидной последовательности антисмысловой цепи AD-1479372.

11. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что указанный агент на основе дцРНК содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

12. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что по существу все нуклеотиды указанной смысловой цепи; по существу все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи содержат модификацию; или по существу все нуклеотиды

указанной смысловой цепи и по существу все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи содержат модификацию.

13. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что все нуклеотиды указанной смысловой цепи содержат модификацию; все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи содержат модификацию; или все нуклеотиды указанной смысловой цепи и все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи содержат модификацию.

14. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 11-13, отличающийся тем, что по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситимидинового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксидеокси-модифицированного нуклеотида, блокированного нуклеотида, неблокированного нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, ограниченного этилнуклеотида, нуклеотида без азотистого основания, 2'-амин-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидрокси-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата, термически дестабилизирующего нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA), нуклеотида, содержащего 2'-фосфат, и 2-О-(N-метилацетамид)-модифицированного нуклеотида; и их комбинаций.

15. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 11-13, отличающийся тем, что указанные модификации на нуклеотидах выбраны из группы, состоящей из LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтил, 2'-О-алкил, 2'-О-аллил, 2'-С-аллил, 2'-фтор, 2'-дезоксидеокси, 2'-гидрокси и гликоля; и их комбинаций.

16. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 11-13, отличающийся тем, что по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксидеокси-модифицированного нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA), нуклеотида, содержащего 2'-фосфат и винилфосфонатного нуклеотида; и их комбинаций.

17. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 11-13, отличающийся тем, что по меньшей мере одна из указанных модификаций на нуклеотидах представляет собой термически дестабилизирующую нуклеотидную модификацию.

18. Агент на основе дцРНК по п. 17, отличающийся тем, что указанная термически дестабилизирующая нуклеотидная модификация выбрана из группы, состоящей из модификации лишенным азотистого основания нуклеотидом; несовпадения с

противоположным нуклеотидом в дуплексе; и дестабилизирующей модификации сахара, 2'-дезоксификации, ациклического нуклеотида, неблокированных нуклеиновых кислот (UNA) и глицериновой нуклеиновой кислоты (GNA).

19. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что указанная двухцепочечная область представляет собой 19-30 нуклеотидных пар в длину.

20. Агент на основе дцРНК по п. 19, отличающийся тем, что указанная двухцепочечная область представляет собой 19-25 нуклеотидных пар в длину.

21. Агент на основе дцРНК по п. 19, отличающийся тем, что указанная двухцепочечная область представляет собой 19-23 нуклеотидные пары в длину.

22. Агент на основе дцРНК по п. 19, отличающийся тем, что указанная двухцепочечная область представляет собой 23-27 нуклеотидных пар в длину.

23. Агент на основе дцРНК по п. 19, отличающийся тем, что указанная двухцепочечная область представляет собой 21-23 нуклеотидные пары в длину.

24. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что каждая цепь независимо представляет собой не более 30 нуклеотидов в длину.

25. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-24, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь представляет собой 21 нуклеотид в длину и указанная антисмысловая цепь представляет собой 23 нуклеотида в длину.

26. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-25, отличающийся тем, что указанная область комплементарности представляет собой по меньшей мере 17 нуклеотидов в длину.

27. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-26, отличающийся тем, что указанная область комплементарности представляет собой от 19 до 23 нуклеотидов в длину.

28. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-27, отличающийся тем, что указанная область комплементарности представляет собой 19 нуклеотидов в длину.

29. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-28, отличающийся тем, что по меньшей мере одна цепь содержит 3'-липкий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида.

30. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-28, отличающийся тем, что по меньшей мере одна цепь содержит 3'-липкий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

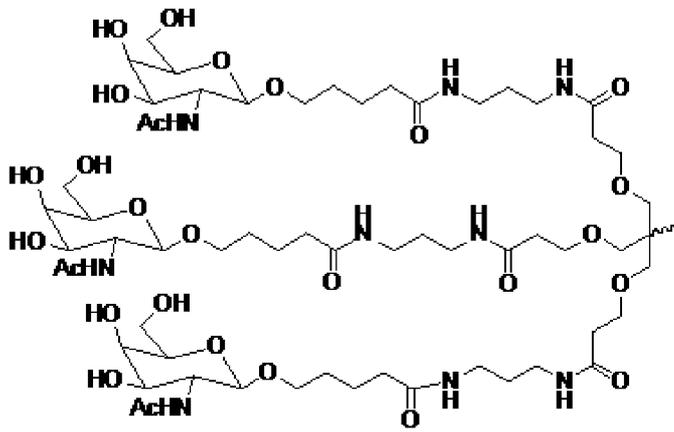
31. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-30, дополнительно содержащий лиганд.

32. Агент на основе дцРНК по п. 31, отличающийся тем, что указанный лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи агента на основе дцРНК.

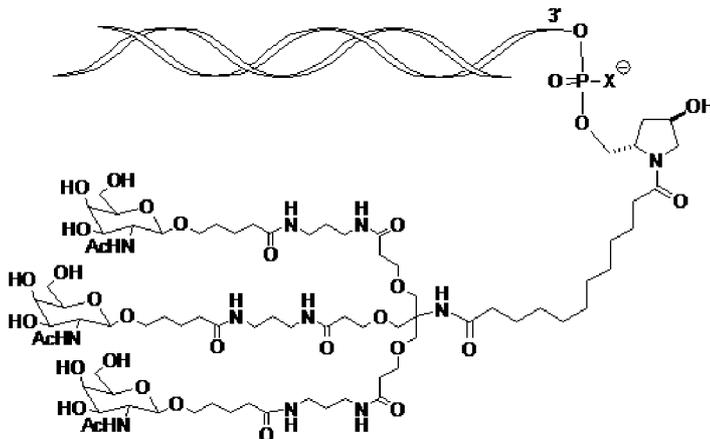
33. Агент на основе дцРНК по п. 31 или п. 32, отличающийся тем, что указанный лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

34. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 31-33, отличающийся тем, что указанный лиганд представляет собой одно или более производных GalNAc, присоединенных посредством одновалентного, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

35. Агент на основе дцРНК по п. 33 или п. 34, отличающийся тем, что указанный лиганд представляет собой



36. Агент на основе дцРНК по п. 35, отличающийся тем, что указанный агент на основе дцРНК конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме



и где X представляет собой O или S.

37. Агент на основе дцРНК по п. 36, отличающийся тем, что указанный X представляет собой O.

38. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-37, отличающийся тем, что указанный агент на основе дцРНК дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

39. Агент на основе дцРНК по п. 38, отличающийся тем, что указанная фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной цепи.

40. Агент на основе дцРНК по п. 39, отличающийся тем, что указанная цепь представляет собой антисмысловую цепь.

41. Агент на основе дцРНК по п. 39, отличающийся тем, что указанная цепь представляет собой смысловую цепь.

42. Агент на основе дцРНК по п. 38, отличающийся тем, что указанная фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи.

43. Агент на основе дцРНК по п. 42, отличающийся тем, что указанная цепь представляет собой антисмысловую цепь.

44. Агент на основе дцРНК по п. 42, отличающийся тем, что указанная цепь представляет собой смысловую цепь.

45. Агент на основе дцРНК по п. 38, отличающийся тем, что указанная фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-конце, так и на 3'-конце одной цепи.

46. Агент на основе дцРНК по п. 45, отличающийся тем, что указанная цепь представляет собой антисмысловую цепь.

47. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-46, отличающийся тем, что указанная пара оснований в положении 1 5'-конца указанной антисмысловой цепи дуплекса представляет собой пару оснований AU.

48. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-47, отличающийся тем, что указанная нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 4 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-*asasguccuUfCfUfuuuuaauuguu*-3' (SEQ ID NO: 18), и указанная нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 4 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-*asdAscadAudAaaaadGafggagcuusgsg*-3' (SEQ ID NO: 19),

где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) A, G, C и U; dA и dG представляют собой 2'-дезоксидA и G; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксид-2'-фтор (2'-F) C и U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

49. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-47, отличающийся тем, что указанная нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 3 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-*asasguccuUfCfUfuuuuaauuguu*-3' (SEQ ID NO: 18), и указанная нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 3 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-*asdAscadAudAaaaadGafggagcuusgsg*-3' (SEQ ID NO: 19),

где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) A, G, C и U; dA и dG представляют собой 2'-дезоксидA и G; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксид-2'-фтор (2'-F) C и U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

50. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-47, отличающийся тем, что указанная нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 2 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-*asasguccuUfCfUfuuuuaauuguu*-3' (SEQ ID NO: 18), и указанная нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 2 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-*asdAscadAudAaaaadGafggagcuusgsg*-3' (SEQ ID NO: 19),

где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) A, G, C и U; dA и dG представляют собой 2'-дезоксидA и G; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксид-2'-фтор (2'-F) C и U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

51. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-47, отличающийся тем, что указанная нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 1 основанием от нуклеотидной последовательности 5'-*asasguccuUfCfUfuuuuaauuguu*-3' (SEQ ID NO: 18),

и указанная нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 1 основанием от нуклеотидной последовательности 5'-asdAscAdAudAaaaadGaAfggagcuusgsg-3' (SEQ ID NO: 19),

где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; dA и dG представляют собой 2'-дезоксидА и G; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксид-2'-фтор (2'-F) С и U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

52. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-47, отличающийся тем, что указанная нуклеотидная последовательность смысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asagcuccuUfCfUfuuuuuuuuuuu-3' (SEQ ID NO: 18), и указанная нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asdAscAdAudAaaaadGaAfggagcuusgsg-3' (SEQ ID NO: 19),

где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; dA и dG представляют собой 2'-дезоксидА и G; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксид-2'-фтор (2'-F) С и U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

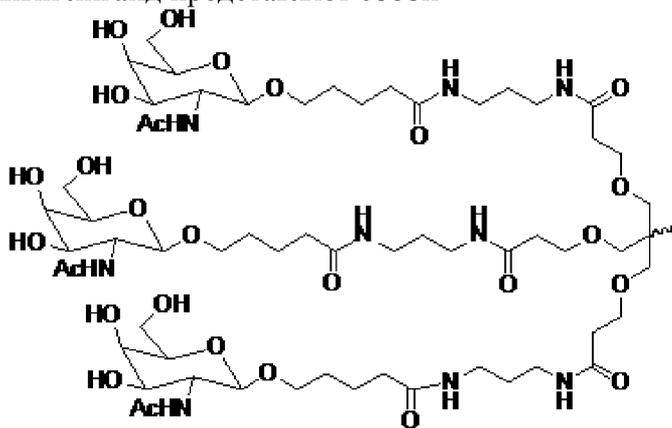
53. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 48-52, дополнительно содержащий лиганд.

54. Агент на основе дцРНК по п. 53, отличающийся тем, что указанный лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи агента на основе дцРНК.

55. Агент на основе дцРНК по п. 53 или п. 54, отличающийся тем, что указанный лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

56. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 53-55, отличающийся тем, что указанный лиганд представляет собой одно или более производных GalNAc, присоединенных посредством одновалентного, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

57. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 53-56, отличающийся тем, что указанный лиганд представляет собой



58. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 48-57, отличающийся тем, что указанная нуклеотидная последовательность смысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asagcuccuUfCfUfuuuuuuuuuuuL96-3' (SEQ ID NO: 20), и указанная нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asdAscAdAudAaaaadGaAfggagcuusgsg-3' (SEQ ID NO: 19),

61. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-47, отличающийся тем, что указанная нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 3 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-asasgucCfuUfCfUfuuuuuuuuuuu-3' (SEQ ID NO: 21), и указанная нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 3 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-asAfscAAUfaaaaagaAfgGfagcuusasa-3' (SEQ ID NO: 22); или

тем, что указанная нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 3 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-asgscuccUfuCfUfUfuuuuuuuuuuu-3' (SEQ ID NO: 23), и указанная нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 3 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-asAfsacaAfuaaaaagAfaGfgagcususa-3' (SEQ ID NO: 24),

где а, г, с и и представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксид-2'-фтор (2'-F) С и U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

62. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-47, отличающийся тем, что указанная нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 2 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-asasgucCfuUfCfUfuuuuuuuuuuu-3' (SEQ ID NO: 21), и указанная нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 2 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-asAfscAAUfaaaaagaAfgGfagcuusasa-3' (SEQ ID NO: 22); или

тем, что указанная нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 2 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-asgscuccUfuCfUfUfuuuuuuuuuuu-3' (SEQ ID NO: 23), и указанная нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 2 основаниями от нуклеотидной последовательности 5'-asAfsacaAfuaaaaagAfaGfgagcususa-3' (SEQ ID NO: 24),

где а, г, с и и представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксид-2'-фтор (2'-F) С и U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

63. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-47, отличающийся тем, что указанная нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 1 основанием от нуклеотидной последовательности 5'-asasgucCfuUfCfUfuuuuuuuuuuu-3' (SEQ ID NO: 21), и указанная нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 1 основанием от нуклеотидной последовательности 5'-asAfscAAUfaaaaagaAfgGfagcuusasa-3' (SEQ ID NO: 22); или

тем, что указанная нуклеотидная последовательность смысловой цепи отличается не более чем 1 основанием от нуклеотидной последовательности 5'-asgscuccUfuCfUfUfuuuuuuuuuuu-3' (SEQ ID NO: 23), и указанная нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи отличается не более чем 1 основанием от

нуклеотидной последовательности 5'-asAfsacaAfuaaaaagAfaGfgagcususa-3' (SEQ ID NO: 24),

где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксидезокси-2'-фтор (2'-F) С и U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

64. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-47, отличающийся тем, что указанная нуклеотидная последовательность смысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asasgcucCfuUfCfUfuuuuuauuguu-3' (SEQ ID NO: 21), и указанная нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asAfscaaUfaaaaagaAfgGfgagcuusasa-3' (SEQ ID NO: 22); или

тем, что указанная нуклеотидная последовательность смысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asgscuccUfuCfUfUfuuuuuuguuu-3' (SEQ ID NO: 23), и указанная нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asAfsacaAfuaaaaagAfaGfgagcususa-3' (SEQ ID NO: 24),

где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксидезокси-2'-фтор (2'-F) С и U; s представляет собой фосфотиоатную связь.

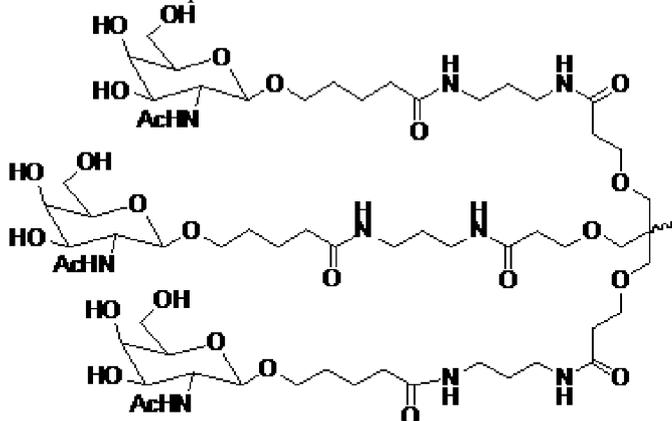
65. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 60-64, дополнительно содержащий лиганд.

66. Агент на основе дцРНК по п. 65, отличающийся тем, что указанный лиганд конъюгирован с 3'-концом указанной смысловой цепи указанного агента на основе дцРНК.

67. Агент на основе дцРНК по п. 65 или п. 66, отличающийся тем, что указанный лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

68. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 65-67, отличающийся тем, что указанный лиганд представляет собой одно или более производных GalNAc, присоединенных посредством одновалентного, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

69. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 65-68, отличающийся тем, что указанный лиганд представляет собой



70. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 60-69, отличающийся тем, что указанная нуклеотидная последовательность смысловой цепи содержит нуклеотидную

последовательность 5'-asasgcucCfuUfCfUfuuuuauuguuL96-3' (SEQ ID NO: 25), и указанная нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asAfscaaUfaaaaagaAfgGfagcuusasa-3' (SEQ ID NO: 22); или

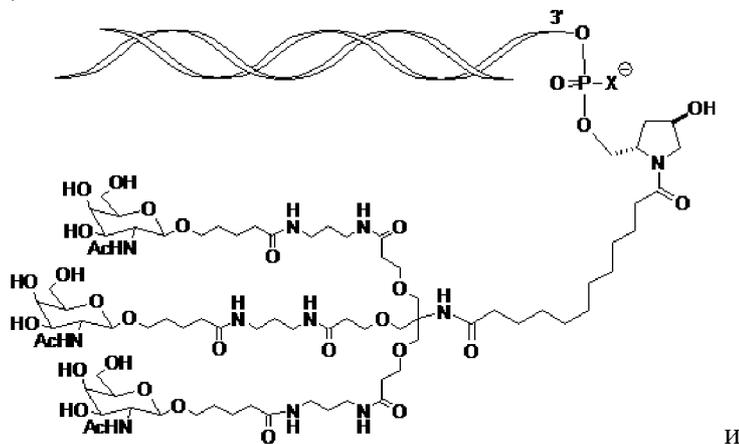
тем, что указанная нуклеотидная последовательность смысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asgscuccUfuCfUfUfuuuuauuguuuL96-3' (SEQ ID NO: 281), и указанная нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asAfsacaAfuaaaaagAfaGfgagcuusasa-3' (SEQ ID NO: 24)

где а, г, с и и представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксидезокси-2'-фтор (2'-F) С и U; s представляет собой фосфотиоатную связь, и L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканойл]-4-гидроксипролин.

71. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 60-70, отличающийся тем, что указанная нуклеотидная последовательность смысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asasgcucCfuUfCfUfuuuuauuguu-3' (SEQ ID NO: 21), и указанная нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asAfscaaUfaaaaagaAfgGfagcuusasa-3' (SEQ ID NO: 22);

где а, г, с и и представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксидезокси-2'-фтор (2'-F) С и U; s представляет собой фосфотиоатную связь, и

причем лиганд конъюгирован с 3'-концом указанной смысловой цепи, как показано на следующей схеме

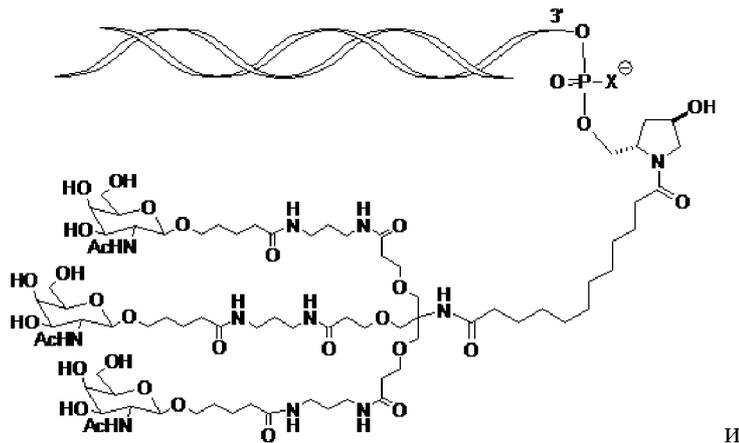


где X представляет собой O.

72. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 60-70, отличающийся тем, что указанная нуклеотидная последовательность смысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asgscuccUfuCfUfUfuuuuauuguuu-3' (SEQ ID NO: 23), и указанная нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи содержит нуклеотидную последовательность 5'-asAfsacaAfuaaaaagAfaGfgagcuusasa-3' (SEQ ID NO: 24)

где а, г, с и и представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; Cf и Uf представляют собой 2'-дезоксидезокси-2'-фтор (2'-F) С и U; s представляет собой фосфотиоатную связь, и

причем лиганд конъюгирован с 3'-концом указанной смысловой цепи, как показано на следующей схеме



где X представляет собой O.

73. Клетка, содержащая агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-72.

74. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена, кодирующего ангиопоэтин-подобный белок 3 (ANGPTL3), содержащая агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-72.

75. Фармацевтическая композиция по п. 74, отличающаяся тем, что указанный агент на основе дцРНК находится в незабуференном растворе.

76. Фармацевтическая композиция по п. 75, отличающаяся тем, что указанный незабуференный раствор представляет собой физиологический раствор или воду.

77. Фармацевтическая композиция по п. 74, отличающаяся тем, что указанный агент на основе дцРНК находится в буферном растворе.

78. Фармацевтическая композиция по п. 77, отличающаяся тем, что указанный буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию.

79. Фармацевтическая композиция по п. 78, отличающаяся тем, что указанный буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ).

80. Способ ингибирования экспрессии гена ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3) в клетке, отличающийся тем, что указанный способ включает приведение указанной клетки в контакт с агентом на основе дцРНК по любому из пп. 1-72 или фармацевтической композицией по любому из пп. 74-79, что ингибирует экспрессию гена ANGPTL3 в указанной клетке.

81. Способ по п. 80, отличающийся тем, что указанная клетка находится в организме субъекта.

82. Способ по п. 81, отличающийся тем, что указанный субъект представляет собой человека.

83. Способ по п. 82, отличающийся тем, что указанный субъект имеет ANGPTL3-ассоциированное нарушение.

84. Способ по п. 83, отличающийся тем, что указанное ANGPTL3-ассоциированное нарушение представляет собой нарушение метаболизма липидов.

85. Способ по п. 84, отличающийся тем, что указанное нарушение метаболизма липидов представляет собой гиперлипидемию или гипертриглицеридемию.

86. Способ по любому из пп. 80-85, отличающийся тем, что приведение указанной клетки в контакт с указанным агентом на основе дцРНК ингибирует экспрессию ANGPTL3 по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

87. Способ по любому из пп. 80-86, отличающийся тем, что ингибирование экспрессии ANGPTL3 приводит к уменьшению уровня белка ANGPTL3 в сыворотке крови субъекта по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

88. Способ лечения субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть получена польза от снижения экспрессии ангиопэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3), включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента на основе дцРНК по любому из пп. 1-72 или фармацевтической композиции по любому из пп. 74-79, что обеспечивает лечение указанного субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть получена польза от снижения экспрессии ANGPTL3.

89. Способ предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть получена польза от снижения экспрессии ангиопэтин-подобного 3 (ANGPTL3), включающий введение указанному субъекту профилактически эффективного количества агента на основе дцРНК по любому из пп. 1-72 или фармацевтической композиции по любому из пп. 74-79, что предотвращает по меньшей мере один симптом у указанного субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть получена польза от снижения экспрессии ANGPTL3.

90. Способ по п. 88 или п. 89, отличающийся тем, что указанное нарушение представляет собой ANGPTL3-ассоциированное нарушение.

91. Способ по п. 90, отличающийся тем, что указанное ANGPTL3-ассоциированное нарушение представляет собой нарушение метаболизма липидов.

92. Способ по п. 91, отличающийся тем, что указанное нарушение метаболизма липидов представляет собой гиперлипидемию или гипертриглицеридемию.

93. Способ по любому из пп. 88-92, отличающийся тем, что указанный субъект представляет собой человека.

94. Способ по любому из пп. 88-93, отличающийся тем, что введение указанного агента субъекту вызывает уменьшение уровня одного или более липидов сыворотки крови и/или уменьшение накопления белка ANGPTL3.

95. Способ по любому из пп. 88-94, отличающийся тем, что указанный агент на основе дцРНК вводят указанному субъекту в дозе от примерно 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг.

96. Способ по любому из пп. 88-95, отличающийся тем, что указанный агент на основе дцРНК вводят субъекту подкожно.

97. Способ по любому из пп. 88-96, дополнительно включающий определение уровня ANGPTL3 в образце(ах) от субъекта.

98. Способ по п. 97, отличающийся тем, что указанный уровень ANGPTL3 в образце(ах) от субъекта представляет собой уровень белка ANGPTL3 в образце(ах) крови или сыворотки крови.

99. Способ по любому из пп. 88-98, дополнительно включающий введение указанному субъекту дополнительного терапевтического агента для лечения ANGPTL3-ассоциированного нарушения.

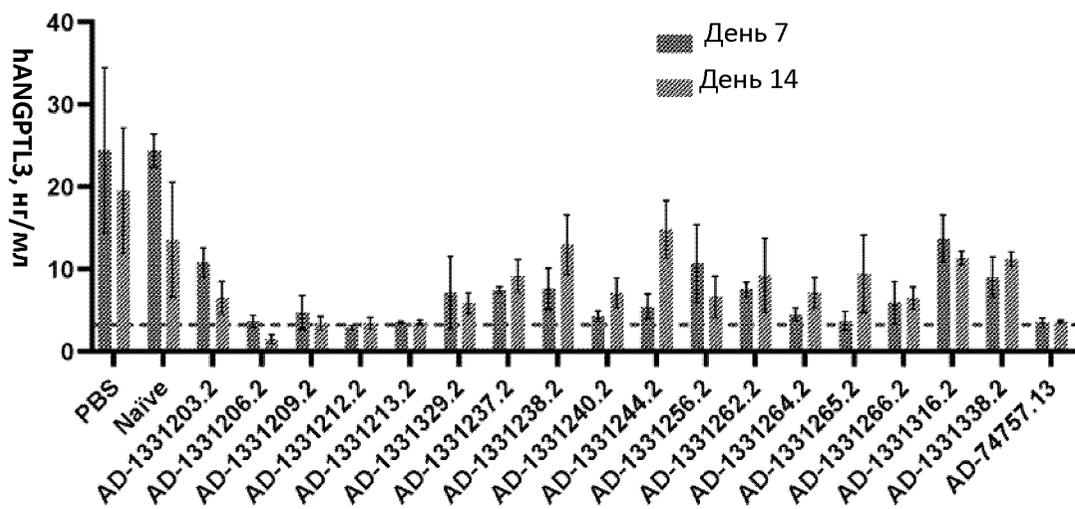
100. Набор, содержащий агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-72 или фармацевтическую композицию по любому из пп. 74-79.

101. Флакон, содержащий агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-72 или фармацевтическую композицию по любому из пп. 74-79.

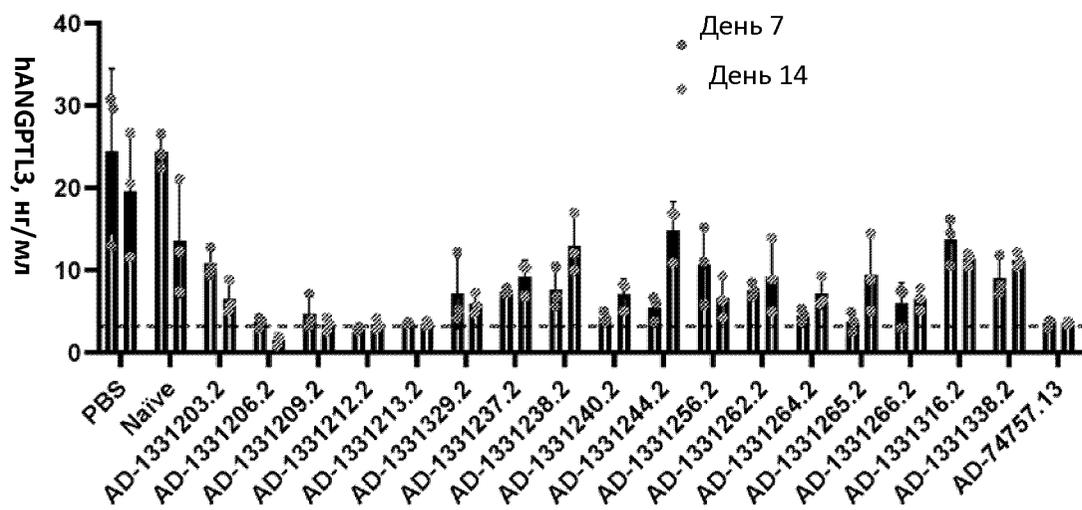
102. Шприц, содержащий агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-72 или фармацевтическую композицию по любому из пп. 74-79.

По доверенности

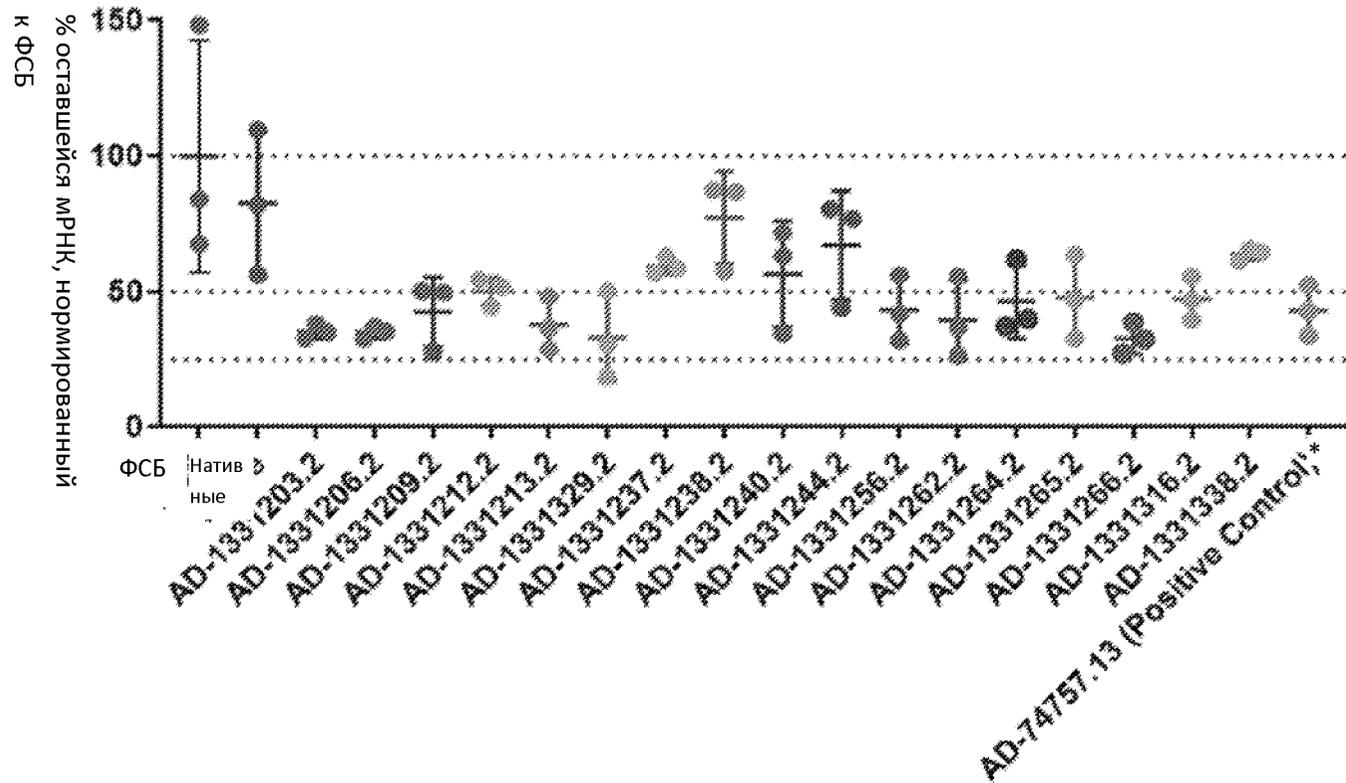
Фигура 1А



Фигура 1В

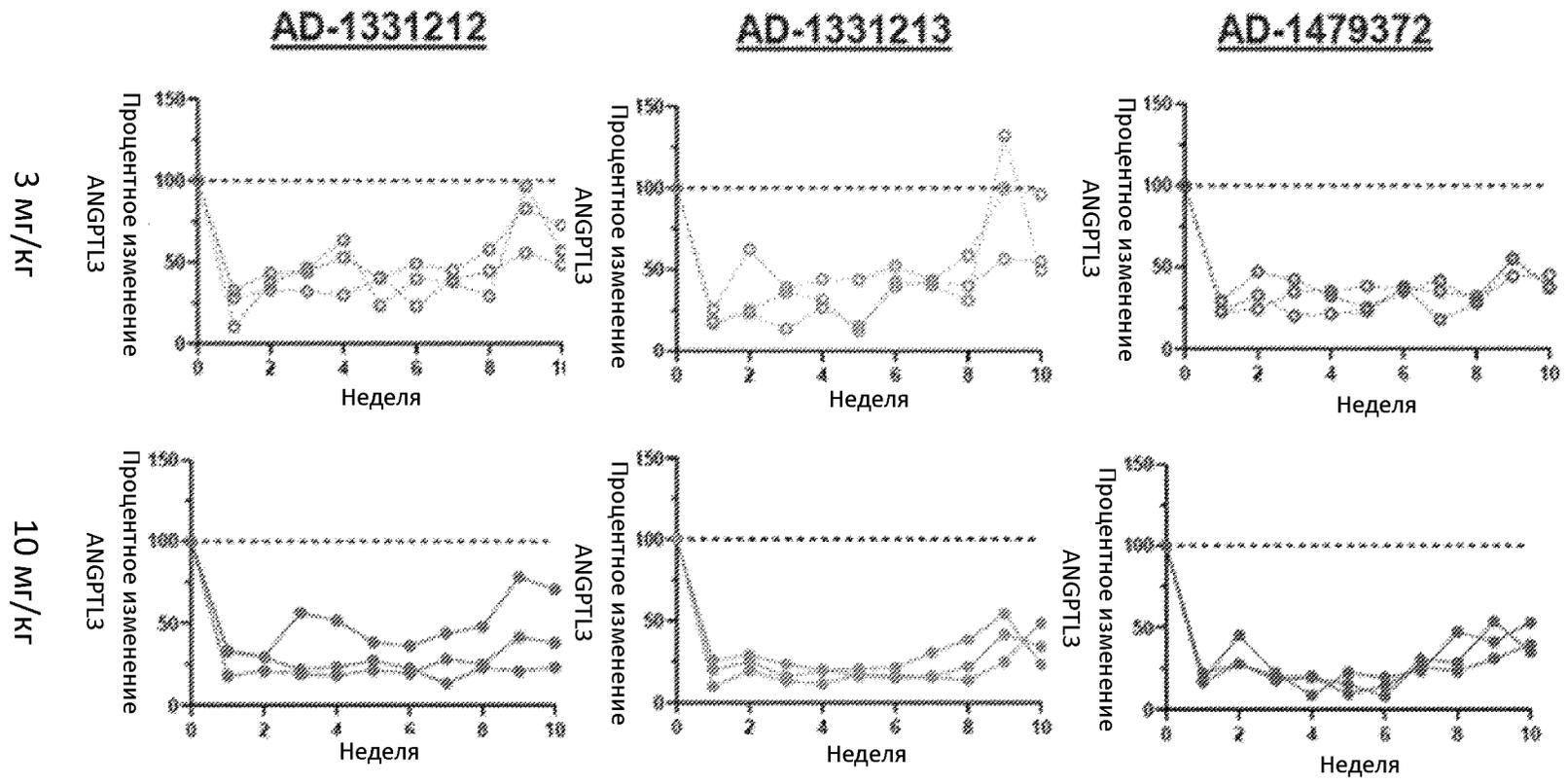


1193 - ANGPTL3 #2
D14 qPCR



Фигура 2

*(Положительный контроль)



Фигура 3