

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034363**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.30

(51) Int. Cl. **C12N 15/113** (2010.01)
A61P 3/12 (2006.01)

(21) Номер заявки
201201457

(22) Дата подачи заявки
2011.04.20

**(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ
ГЕНА БЕТА-ЕНАС И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 61/327,379; 61/333,398

(32) 2010.04.23; 2010.05.11

(33) US

(43) 2013.04.30

(86) PCT/EP2011/056299

(87) WO 2011/131707 2011.10.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭРРОУХЕД ФАРМАСЬЮТИКАЛС,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Де-Фужероль Антонен, Динер
Джон Л. (US), Хикман Эмма (GB),
Хинкле Грегори, Милстейн Стюарт,
Пюлишино Анн-Мари, Спраге
Эндрью (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н., Павловский А.Н. (RU)

(56) EP-A1-1752536

E. CACI ET AL.: "Epithelial Sodium Channel Inhibition in Primary Human Bronchial Epithelia by Transfected siRNA", AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, vol. 40, no. 2, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 211-216, XP55002460, ISSN: 1044-1549, DOI: 10.1165/rcmb.2007-04560C, the whole document & Emanuela Caci: "Online supplement to Epithelial Sodium Channel Inhibition in Primary Human Bronchial Epithelia by Transfected siRNA", American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 21 August 2008 (2008-08-21), pages 1-5, XP55002463, Retrieved from the Internet: URL: <http://ajrcmb.atsjournals.org/cgi/data/40/2/211/DC1/1> [retrieved on 2011-07-11]

JERNIGAN NIKKI L. ET AL.: "Myogenic vasoconstriction in mouse renal interlobar arteries: role of endogenous beta and gamma ENaC", AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. RENAL PHYSIOLOGY DEC 2006 LNKD-PUBMED:16849693, vol. 291, no. 6, December 2006 (2006-12), pages F1184-F1191, XP002649088, ISSN: 1931-857X, the whole document
WO-A2-2008152131

(57) Изобретение относится к фармацевтической композиции для ингибирования экспрессии гена Beta-ENaC, включающей антисмысловую и смысловую цепи агента РНКи к указанному гену. Также изобретение относится к применению заявленной композиции для лечения патологического состояния, опосредованного, по меньшей мере частично, экспрессией гена Beta-ENaC у индивидуума, и соответствующим способам лечения и подавления экспрессии гена Beta-ENaC у индивидуума.

B1

034363

034363 B1

По заявке на данное изобретение испрашивается приоритет в соответствии с разделом 35 Свода законов США §119 (а)-(г) на основе предварительной заявки на патент США US 61/327379, поданной 23 апреля 2003 г., и предварительной заявки на патент США 61/333398, поданной 11 мая 2010 г., содержание которых полностью включено в настоящее изобретение.

Предпосылки создания изобретения

Слизистая поверхность между окружающей средой и организмом обладает многими защитными механизмами. Одна из форм защиты заключается в увлажнении поверхности. Количество жидкости является показателем баланса между секрецией жидкости эпителием (которая часто отражает секрецию аниона, связанную с водой и катионным противоионом) и абсорбцией жидкости (которая часто отражает абсорбцию Na^+ , связанную с водой и анионным противоионом). Многие заболевания слизистых поверхностей возникают из-за слишком малого количества жидкости, вызванного нарушением баланса между секрецией (слишком малой) и абсорбцией (слишком большой). Один из способов поддержания баланса жидкостного слоя заключается в снижении абсорбции жидкости, опосредованной Na^+ -каналом.

Потенциал-независимые чувствительные к амилориду натриевые каналы контролируют транспорт жидкости и электролитов через эпителий во многих органах. Апикальные мембраны многих форм эпителия с низкой проницаемостью межклеточных путей имеют натриевые каналы, которые главным образом отличаются высоким сродством к диуретическому блокатору амилориду. Эти каналы опосредуют первую стадию активной натриевой реабсорбции, важной для поддержания солевого и водного гомеостаза. У позвоночных эти каналы контролируют реабсорбцию натрия в почках, толстой кишке, легких и потовых железах; они также участвуют во вкусовом восприятии.

Стадия ограничения скорости абсорбции Na^+ и жидкости опосредуется эпителиальным натриевым каналом (epithelial Na^+ channel - ENaC). Такие натриевые каналы являются гетеромерными комплексами, состоящими из трех субъединиц: Alpha-ENaC, Beta-ENaC и Gamma-ENaC.

Ген Beta-ENaC (также обозначаемый SCNN1B) кодирует бета-субъединицу натриевого канала, и мутации этого гена и/или его измененная экспрессия связаны с несколькими заболеваниями (и/или с лечением этих заболеваний), включая муковисцидоз, псевдогипоальдостеронизм типа 1 (ПГА1), синдром Лиддла, гипертонию, алкалоз, гипокалиемию и гипертонию, связанную с ожирением.

Таким образом, существует потребность в лечении заболеваний, связанных с бета-субъединицей эпителиальных натриевых каналов (Beta-ENaC).

Краткое описание изобретения

Настоящее описание охватывает фармацевтические композиции, содержащие агенты РНКи к Beta-ENaC, которые применимы для лечения заболеваний, связанных с бета-субъединицей эпителиальных натриевых каналов (Beta-ENaC), например муковисцидоза, псевдогипоальдостеронизма типа 1 (ПГА1), синдрома Лиддла, гипертонии, алкалоза, гипокалиемии и ожирения, связанного с гипертонией. Настоящее описание охватывает способ лечения человека с патологическим состоянием, опосредованным, по меньшей мере частично, экспрессией alpha-ENaC, который включает стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества агента РНКи к Beta-ENaC.

Настоящее описание представляет фармацевтические композиции, содержащие специфические агенты РНКи, и способы, применимые для снижения уровня Beta-ENaC у субъекта, например млекопитающего, например человека.

Настоящее описание специфически предусматривает двухцепочечные агенты РНКи, включающие по меньшей мере 15 или более последовательно расположенных нуклеотидов Beta-ENaC. В частности, настоящее описание предусматривает агенты, включающие последовательности из 15 или более последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от последовательностей агентов РНКи, представленных, например, в табл. 1. Агенты РНКи, в частности, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения могут включать менее 30 нуклеотидов в цепи, например 18-23 нуклеотида, и/или 19-21 нуклеотид, и/или, например, нуклеотиды, предусмотренные в табл. 1.

Двухцепочечные агенты РНКи могут иметь тупые концы или выступы из 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов (т.е. 1-4 нуклеотида) с одного или обоих 3'- и/или 5'-концов. Двухцепочечные агенты РНКи также могут необязательно включать один или два 3'-кэпа и/или один или несколько модифицированных нуклеотидов. К предусмотренным в настоящем изобретении модифицированным вариантам относятся те, которые в другом отношении идентичны, но содержат замещения природного нуклеотида на соответствующий модифицированный нуклеотид.

Кроме того, агент РНКи может состоять только из природных рибонуклеотидных субъединиц или из одной или нескольких замещающих нуклеотидных субъединиц, содержащих одну или несколько модификаций по сахару, фосфату или основанию, независимо от того, включает ли он рибонуклеотидные субъединицы или дезоксирибонуклеотидные субъединицы. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированные варианты описанных агентов РНКи включают агенты РНКи с той же последовательностью, но с одной или несколькими модификациями по одному или нескольким сахарам, фосфатам или основаниям одной или нескольких нуклеотидных субъединиц. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения модификации улучшают эффективность, стабильность и/или снижают иммуногенность агента РНКи. Один из вариантов осуществления настоящего изобрете-

ния относится к двухцепочечному олигонуклеотиду, включающему по меньшей мере одно неприродное нуклеиновое основание. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения неприродным нуклеиновым основанием является дифтортолил, нитроиндолил, нитропирролил или нитроимидазолил. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения неприродным нуклеиновым основанием является дифтортолил. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения только одна из двух олигонуклеотидных цепей содержит неприродное нуклеиновое основание.

Агент (агенты) РНКи могут быть необязательно присоединены к лиганду, выбранному для улучшения одного или нескольких признаков, например стабильности, распределения и/или потребления клеткой агента, например, холестерина или его производного. Агент (агенты) РНКи могут быть представлены отдельно или в виде части фармацевтической композиции, используемой в способах, описанных в настоящем изобретении. Особым образом фармацевтическая композиция может быть переработана для доставки в легкие или носовой проход или переработана для парентерального введения. Фармацевтические композиции могут необязательно включать два или несколько агента РНКи, каждый из которых направлен на один и тот же или на разные сегменты иРНК Beta-ENaC. Необязательно фармацевтические композиции могут дополнительно включать или использоваться вместе с каким-либо известным лечением какого-либо заболевания, связанного с Beta-ENaC.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способы снижения уровня иРНК Beta-ENaC в клетке, особенно в случае заболевания, отличающегося сверхэкспрессией или гиперактивностью ENaC. Настоящее изобретение также предусматривает способ лечения человека с патологическим состоянием, опосредованным, по меньшей мере частично, экспрессией Beta-ENaC, который включает стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества агента РНКи Beta-ENaC. Такие способы включают стадию введения одного из агентов РНКи по настоящему изобретению субъекту согласно описанному ниже. Настоящие способы используют клеточные механизмы, участвующие в РНК-интерференции, для избирательного разрушения РНК-мишени в клетке и включаются на стадии контакта клеток с одним из агентов РНКи по настоящему изобретению. Такие способы могут быть выполнены непосредственно на клетках или на млекопитающих путем введения субъекту одного из агентов РНКи/фармацевтических композиций по настоящему изобретению. Снижение РНК-мишени Beta-ENaC в клетке приводит к снижению количества вырабатываемого кодированного белка Beta-ENaC. В организме это может привести к снижению возможной дифференциации эпителия, сбалансированной абсорбции жидкости и повышенного клиренса реснитчатого эпителия.

К способам и композициям по настоящему изобретению относятся, например, способы и композиции агента РНКи к Beta-ENaC, которые могут применяться в каких-либо дозах и/или с каким-либо составом, описанным в настоящем изобретении, а также с каким-либо способом введения, описанным в настоящем изобретении.

Детали одного или нескольких вариантов осуществления настоящего изобретения приведены ниже вместе с фигурами и описанием. Другие признаки, объекты и преимущества настоящего изобретения могут быть поняты яснее благодаря представленному в настоящем описании, фигурах, а также в формуле изобретения.

Краткое описание фигур

Фиг. 1А и 1Б представляют способность агентов РНКи AD20807, AD20826, AD20832, AS20834, AD20848 и AD20861 вызывать нокдаун действия Beta-ENaC *in vivo*.

Фиг. 2А-2В представляют *in vitro* воздействие агента РНКи Beta-ENaC AD20832 на функциональную активность канала ENaC в эпителиальных клетках бронхов человека.

Подробное описание изобретения

Настоящее описание охватывает агенты РНКи к Beta-ENaC, которые могут быть применены для лечения заболеваний, связанных с бета-субъединицей эпителиальных натриевых каналов (бета-ENaC) (например, заболеваний, ассоциированных с мутациями и/или с измененными экспрессией, уровнем и/или действием Beta-ENaC, и/или заболеваний, которые поддаются лечению путем модулирования экспрессии, уровня и/или действия Beta-ENaC), например муковисцидоза, псевдогипоальдостеронизма типа 1 (ПГА1), синдрома Лиддла, гипертонии, алкалоза, гипокалиемии и гипертонии, связанной с ожирением. Настоящее изобретение также предусматривает способы лечения человека с патологическим состоянием, опосредованным, по меньшей мере частично, экспрессией Beta-ENaC, включающие стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества агента РНКи Beta-ENaC.

К различным вариантам осуществления настоящего изобретения относятся следующие.

Агент РНКи, содержащий описанную в настоящем изобретении антисмысловую цепь.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции, включающей агент РНКи, содержащий смысловую и антисмысловую цепи, причем антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи агента РНКи, специфичного в отношении Beta-ENaC (или какого-либо набора перекрывающихся агентов РНКи, специфичных в отношении Beta-ENaC), предусмотренного, например, в табл. 1. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции, включающей агент РНКи, содержащий смысловую и антисмысловую цепи, причем антисмысловая цепь

содержит по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи агента РНКи из какой-либо последовательности, предусмотренной в настоящем изобретении. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции, включающей агент РНКи, содержащий первую цепь и вторую цепь, причем первая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от последовательности первой цепи, и вторая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от последовательности второй цепи какого-либо агента РНКи, предусмотренного в настоящем изобретении.

К определенным дуплексам относятся приводимые ниже дуплексы, причем каждый дуплекс включает комплект последовательностей, в котором первая последовательность SEQ ID NO соответствует первой цепи (например, смысловой цепи) и вторая последовательность SEQ ID NO соответствует второй цепи (например, антисмысловой цепи): AD-20805 (последовательности SEQ ID NO: 111 и 112); AD-20806 (последовательности: 113 и 114); AD-20807 (последовательности: 115 и 116); AD-20808 (последовательности: 117 и 118); AD-20809 (последовательности: 119 и 120); AD-20810 (последовательности: 121 и 122); AD-20811 (последовательности: 123 и 124); AD-20812 (последовательности: 125 и 126); AD-20813 (последовательности: 127 и 128); AD-20814 (последовательности: 129 и 130); AD-20815 (последовательности: 131 и 132); AD-20816 (последовательности: 133 и 134); AD-20817 (последовательности: 135 и 136); AD-20818 (последовательности: 137 и 138); AD-20819 (последовательности: 139 и 140); AD-20820 (последовательности: 141 и 142); AD-20821 (последовательности: 143 и 144); AD-20822 (последовательности: 145 и 146); AD-20823 (последовательности: 147 и 148); AD-20824 (последовательности: 149 и 150); AD-20825 (последовательности: 151 и 152); AD-20826 (последовательности: 153 и 154); AD-20827 (последовательности: 155 и 156); AD-20828 (последовательности: 157 и 158); AD-20829 (последовательности: 159 и 160); AD-20830 (последовательности: 161 и 162); AD-20831 (последовательности: 163 и 164); AD-20832 (последовательности: 165 и 166); AD-20833 (последовательности: 167 и 168); AD-20834 (последовательности: 169 и 170); AD-20835 (последовательности: 171 и 172); AD-20836 (последовательности: 173 и 174); AD-20837 (последовательности: 175 и 176); AD-20838 (последовательности: 177 и 178); AD-20839 (последовательности: 179 и 180); AD-20840 (последовательности: 181 и 182); AD-20841 (последовательности: 183 и 184); AD-20842 (последовательности: 185 и 186); AD-20843 (последовательности: 187 и 188); AD-20844 (последовательности: 189 и 190); AD-20845 (последовательности: 191 и 192); AD-20846 (последовательности: 193 и 194); AD-20847 (последовательности: 195 и 196); AD-20848 (последовательности: 197 и 198); AD-20849 (последовательности: 199 и 200); AD-20850 (последовательности: 201 и 202); AD-20851 (последовательности: 203 и 204); AD-20852 (последовательности: 205 и 206); AD-20861 (последовательности: 207 и 208); AD-20862 (последовательности: 209 и 210); AD-20863 (последовательности: 211 и 212); AD-20864 (последовательности: 213 и 214); AD-20865 (последовательности: 215 и 216); AD-20866 (последовательности: 217 и 218) и AD-20867 (последовательности: 219 и 220) и их модифицированные варианты.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают модифицированные варианты определенных дуплексов, причем каждый дуплекс включает комплекс последовательностей SEQ ID NO, в котором первая последовательность SEQ ID NO соответствует первой цепи (например, смысловой цепи) и вторая последовательность SEQ ID NO соответствует второй цепи (например, антисмысловой цепи), которые выбраны из группы, состоящей из дуплексов: AD-20805 (последовательности: 1 и 2); AD-20806 (последовательности: 3 и 4); AD-20807 (последовательности: 5 и 6); AD-20808 (последовательности: 7 и 8); AD-20809 (последовательности: 9 и 10); AD-20810 (последовательности: 11 и 12); AD-20811 (последовательности: 13 и 14); AD-20812 (последовательности: 15 и 16); AD-20813 (последовательности: 17 и 18); AD-20814 (последовательности: 19 и 20); AD-20815 (последовательности: 21 и 22); AD-20816 (последовательности: 23 и 24); AD-20817 (последовательности: 25 и 26); AD-20818 (последовательности: 27 и 28); AD-20819 (последовательности: 29 и 30); AD-20820 (последовательности: 31 и 32); AD-20821 (последовательности: 33 и 34); AD-20822 (последовательности: 35 и 36); AD-20823 (последовательности: 37 и 38); AD-20824 (последовательности: 39 и 40); AD-20825 (последовательности: 41 и 42); AD-20826 (последовательности: 43 и 44); AD-20827 (последовательности: 45 и 46); AD-20828 (последовательности: 47 и 48); AD-20829 (последовательности: 49 и 50); AD-20830 (последовательности: 51 и 52); AD-20831 (последовательности: 53 и 54); AD-20832 (последовательности: 55 и 56); AD-20833 (последовательности: 57 и 58); AD-20834 (последовательности: 59 и 60); AD-20835 (последовательности: 61 и 62); AD-20836 (последовательности: 63 и 64); AD-20837 (последовательности: 65 и 66); AD-20838 (последовательности: 67 и 68); AD-20839

(последовательности: 69 и 70); AD-20840 (последовательности: 71 и 72); AD-20841
 (последовательности: 73 и 74); AD-20842 (последовательности: 75 и 76); AD-20843
 (последовательности: 77 и 78); AD-20844 (последовательности: 79 и 80); AD-20845
 (последовательности: 81 и 82); AD-20846 (последовательности: 83 и 84); AD-20847
 (последовательности: 85 и 86); AD-20848 (последовательности: 87 и 88); AD-20849
 (последовательности: 89 и 90); AD-20850 (последовательности: 91 и 92); AD-20851
 (последовательности: 93 и 94); AD-20852 (последовательности: 95 и 96); AD-20861
 (последовательности: 97 и 98); AD-20862 (последовательности: 99 и 100); AD-20863
 (последовательности: 101 и 102); AD-20864 (последовательности: 103 и 104); AD-20865
 (последовательности: 105 и 106); AD-20866 (последовательности: 107 и 108) и AD-20867
 (последовательности: 109 и 110).

Специфические композиции.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции, включающей агент РНКи, включающий антисмысловую цепь, причем антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи агента РНКи к Beta-ENaC, выбранной из какой-либо последовательности (или перекрывающегося набора последовательностей), предусмотренной в таблице настоящего изобретения (например, табл. 1). В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции, включающей агент РНКи, содержащий смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи агента РНКи к Beta-ENaC, выбранной из какой-либо последовательности (или перекрывающегося набора последовательностей), предусмотренной в таблице настоящего изобретения (например, табл. 1). В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции, включающей агент РНКи, содержащий смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи агента РНКи из какой-либо последовательности, предусмотренной в настоящем изобретении. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции, включающей агент РНКи, содержащий первую цепь и вторую цепь, причем первая цепь включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от последовательности первой цепи, и вторая цепь включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от последовательности второй цепи какого-либо агента РНКи, предусмотренного в настоящем изобретении. К специфическим дуплексам относятся те специфические дуплексы, которые предусмотрены выше и перечислены в виде одной или нескольких последовательностей в табл. 1. Дополнительные модифицированные последовательности (например, последовательности, включающие одно или несколько модифицированных оснований) каждой из указанных выше композиций также рассматриваются в качестве части настоящего изобретения.

В табл. А1 предусматривают последовательности SEQ ID NO для немодифицированной и характерной модифицированной последовательности смысловой и антисмысловой цепей различных агентов РНКи к Beta-ENaC. Композиция оснований каждой из специфических последовательностей, представленных в виде последовательностей SEQ ID NO, подробно рассматривается в табл. 1, и их части предусмотрены в табл. 2.

Таблица А1

Последовательности SEQ ID NO первой и второй цепи
(например, смысловой ("СЦ") и антисмысловой ("АСЦ") цепей)
агентов РНК к Beta-ENaC

Название дуплекса – агента РНК	Последовательность	Модифицированная последовательность SEQ ID NO	Немодифицированная последовательность SEQ ID NO
AD-20805	Смысловая	1	111
	Антисмысловая	2	112
AD-20806	Смысловая	3	113
	Антисмысловая	4	114
AD-20807	Смысловая	5	115
	Антисмысловая	6	116
AD-20808	Смысловая	7	117
	Антисмысловая	8	118
AD-20809	Смысловая	9	119
	Антисмысловая	10	120
AD-20810	Смысловая	11	121
	Антисмысловая	12	122
AD-20811	Смысловая	13	123
	Антисмысловая	14	124
AD-20812	Смысловая	15	125
	Антисмысловая	16	126
AD-20813	Смысловая	17	127
	Антисмысловая	18	128
AD-20814	Смысловая	19	129
	Антисмысловая	20	130
AD-20815	Смысловая	21	131
	Антисмысловая	22	132
AD-20816	Смысловая	23	133
	Антисмысловая	24	134
AD-20817	Смысловая	25	135
	Антисмысловая	26	136

AD-20818	Смысловая	27	137
	Антисмысловая	28	138
AD-20819	Смысловая	29	139
	Антисмысловая	30	140
AD-20820	Смысловая	31	141
	Антисмысловая	32	142
AD-20821	Смысловая	33	143
	Антисмысловая	34	144
AD-20822	Смысловая	35	145
	Антисмысловая	36	146
AD-20823	Смысловая	37	147
	Антисмысловая	38	148
AD-20824	Смысловая	39	149
	Антисмысловая	40	150
AD-20825	Смысловая	41	151
	Антисмысловая	42	152
AD-20826	Смысловая	43	153
	Антисмысловая	44	154
AD-20827	Смысловая	45	155
	Антисмысловая	46	156
AD-20828	Смысловая	47	157
	Антисмысловая	48	158
AD-20829	Смысловая	49	159
	Антисмысловая	50	160
AD-20830	Смысловая	51	161
	Антисмысловая	52	162
AD-20831	Смысловая	53	163
	Антисмысловая	54	164
AD-20832	Смысловая	55	165
	Антисмысловая	56	166
AD-20833	Смысловая	57	167
	Антисмысловая	58	168
AD-20834	Смысловая	59	169
	Антисмысловая	60	170
AD-20835	Смысловая	61	171
	Антисмысловая	62	172
AD-20836	Смысловая	63	173
	Антисмысловая	64	174
AD-20837	Смысловая	65	175
	Антисмысловая	66	176
AD-20838	Смысловая	67	177
	Антисмысловая	68	178
AD-20839	Смысловая	69	179
	Антисмысловая	70	180
AD-20840	Смысловая	71	181
	Антисмысловая	72	182
AD-20841	Смысловая	73	183
	Антисмысловая	74	184
AD-20842	Смысловая	75	185
	Антисмысловая	76	186
AD-20843	Смысловая	77	187
	Антисмысловая	78	188
AD-20844	Смысловая	79	189
	Антисмысловая	80	190
AD-20845	Смысловая	81	191
	Антисмысловая	82	192
AD-20846	Смысловая	83	193
	Антисмысловая	84	194
AD-20847	Смысловая	85	195
	Антисмысловая	86	196
AD-20848	Смысловая	87	197
	Антисмысловая	88	198
AD-20849	Смысловая	89	199
	Антисмысловая	90	200
AD-20850	Смысловая	91	201
	Антисмысловая	92	202
AD-20851	Смысловая	93	203
	Антисмысловая	94	204
AD-20852	Смысловая	95	205
	Антисмысловая	96	206
AD-20861	Смысловая	97	207
	Антисмысловая	98	208
AD-20862	Смысловая	99	209
	Антисмысловая	100	210
AD-20863	Смысловая	101	211
	Антисмысловая	102	212
AD-20864	Смысловая	103	213
	Антисмысловая	104	214
AD-20865	Смысловая	105	215
	Антисмысловая	106	216
AD-20866	Смысловая	107	217
	Антисмысловая	108	218
AD-20867	Смысловая	109	219
	Антисмысловая	110	220

Например, в табл. А1 пример модифицированной последовательности агента РНКи AD-20805 представлен последовательностями SEQ ID NO: 1 (смысловая цепь) и SEQ ID NO: 2 (антисмысловая цепь). Немодифицированная последовательность AD-20805 представлена последовательностями SEQ ID NO: 111 (смысловая цепь) и SEQ ID NO: 112 (антисмысловая цепь). Таким образом, в табл. А1 представлены идентификаторы SEQ ID NO первой и второй цепей немодифицированной последовательности и по меньшей мере одной характерной модифицированной последовательности для каждого из различных агентов РНКи к Beta-ENaC.

Агент РНКи, включающий антисмысловую цепь, описанную в настоящем изобретении

В одном из предпочтительных вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей агент РНКи, включающий антисмысловую цепь, причем антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи агента РНКи к Beta-ENaC, выбранной из антисмысловых цепей в специфических дуплексах, предусмотренных в настоящем изобретении и перечисленных, например, в табл. 1.

Различные специфические варианты такого варианта осуществления описаны ниже.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения композиция дополнительно включает второй агент РНКи к Beta-ENaC. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения второй агент РНКи физически отделен от первого или два физически связаны (например, ковалентно связаны или иным образом конъюгированы).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антисмысловая цепь составляет в длину примерно 30 нуклеотидов или меньше.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения смысловая цепь и антисмысловая цепь из области дуплекса, составляющей в длину примерно от 15 до примерно 30 пар нуклеотидов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антисмысловая цепь составляет в длину примерно от 15 до примерно 36 нуклеотидов, составляет в длину примерно от 18 до примерно 30 нуклеотидов, и дополнительно составляет в длину примерно от 19 до примерно 23 нуклеотидов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антисмысловая цепь имеет в длину примерно от 15 нуклеотидов, примерно от 16 нуклеотидов, примерно от 17 нуклеотидов, примерно от 18 нуклеотидов, примерно от 19 нуклеотидов, примерно от 20 нуклеотидов, примерно от 21 нуклеотида, примерно от 22 нуклеотидов, примерно от 23 нуклеотидов, примерно от 24 нуклеотидов, примерно от 25 нуклеотидов, примерно от 26 нуклеотидов, примерно от 27 нуклеотидов, примерно от 28 нуклеотидов, примерно от 29 нуклеотидов и примерно от 30 нуклеотидов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи включает модификацию, которая приводит к тому, что агент РНКи обладает повышенной стабильностью в биологическом образце или во внешней среде, например в сыворотке крови или в жидкости просвета кишечника.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи включает по меньшей мере одну модификацию каркаса молекулы сахара (например, фосфоротиоатную связь) и/или по меньшей мере один 2'-модифицированный нуклеотид. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения все пиримидины представлены 2'-О-метил-модифицированными нуклеотидами.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи включает по меньшей мере один 5'-уридин-аденин-3' (5'-ua-3') динуклеотид, в котором уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом; и/или по меньшей мере один 5'-уридин-гуанин-3' (5'-ug-3') динуклеотид, в котором 5'-уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом; и/или по меньшей мере один 5'-цитидин-аденин-3' (5'-ca-3') динуклеотид, в котором 5'-цитидин является 2'-модифицированным нуклеотидом; и/или по меньшей мере один 5'-уридин-уридин-3' (5'-uu-3') динуклеотид, в котором 5'-уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи включает 2'-модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-дезоксидеокси, 2'-дезоксидеокси-2'-фтор, 2'-О-метил, 2'-О-метоксиэтил (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропил (2'-О-АР), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил (2'-О-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-О-DMAEOE) и 2'-О-N-метилацетамидо (2'-О-NMA). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения все пиримидины являются 2'-О-метил-модифицированными нуклеотидами.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи содержит тупой конец.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи включает выступ, имеющий 1-4 неспаренных нуклеотида.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи включает выступ с 3'-конца антисмысловой цепи агента РНКи.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи лигирован с одним или несколькими диагностическими соединениями, репортерной группой, агентом перекрестного связывания, частью молекулы, определяющей резистентность к нуклеазе, природным или необычным нуклеиновым основанием, липофильной молекулой, холестерином, липидом, лектином, стероидом, увалом, гецигенином, диосгенином, терпеном, тритерпеном, сарсасапогенином, фрайделином, дериватизированной

эпифрайделанолом литохолиевой кислотой, витамином, углеводом, декстраном, пуллуланом, хитином, хитозаном, синтетическим углеводом, 15-мерным олиголактатом, природным полимером, низкомолекулярным полимером или полимером среднего молекулярного веса, инулином, циклодекстрином, гиалуроновой кислотой, белком, белок-связывающим агентом, интегрин-нацеливающей молекулой, поликатионным агентом, пептидом, полиамином, пептидным миметиком и/или трансферрином.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи способен ингибировать экспрессию гена Beta-ENaC по меньшей мере примерно на 60% в концентрации 10 нМ в клетках H441 *in vitro*.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи способен ингибировать экспрессию гена Beta-ENaC по меньшей мере примерно на 70% в концентрации 10 нМ в клетках H441 *in vitro*.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи способен ингибировать экспрессию гена Beta-ENaC по меньшей мере примерно на 80% в концентрации 10 нМ в клетках H441 *in vitro*.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи способен ингибировать экспрессию гена Beta-ENaC по меньшей мере примерно на 90% в концентрации 10 нМ в клетках H441 *in vitro*.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения величина EC_{50} агента РНКи составляет не более примерно 0,1 нМ.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения величина EC_{50} агента РНКи составляет не более примерно 0,01 нМ.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения величина EC_{50} агента РНКи составляет не более примерно 0,001 нМ.

Агент РНКи, включающий первую и вторую цепи, описанные в настоящем изобретении.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к композиции, включающей агент РНКи, содержащий первую цепь и вторую цепи, причем первая и вторая цепи включают по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от первой и второй цепей соответственно агента РНКи к Beta-ENaC, выбранного из специфических дуплексов, предусмотренных в настоящем изобретении и перечисленных, например, в табл. 1.

Различные специфические варианты осуществления настоящего изобретения описаны ниже.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения композиция дополнительно включает второй агент РНКи к Beta-ENaC. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения второй агент РНКи физически отделен от первого или два агента физически связаны (например, ковалентно связаны или иным образом конъюгированы).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антисмысловая цепь составляет в длину примерно 30 нуклеотидов или меньше.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения смысловая цепь и антисмысловая цепь формируют область дуплекса, составляющую в длину примерно от 15 до примерно 30 пар нуклеотидов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антисмысловая цепь составляет в длину примерно от 15 до примерно 36 нуклеотидов, составляет в длину примерно от 18 до примерно 23 нуклеотидов и составляет в длину примерно от 19 до примерно 23 нуклеотидов. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антисмысловая цепь имеет в длину примерно от 15 нуклеотидов, примерно от 16 нуклеотидов, примерно от 17 нуклеотидов, примерно от 18 нуклеотидов, примерно от 19 нуклеотидов, примерно от 20 нуклеотидов, примерно от 21 нуклеотида, примерно от 22 нуклеотидов, примерно от 23 нуклеотидов, примерно от 24 нуклеотидов, примерно от 25 нуклеотидов, примерно от 26 нуклеотидов, примерно от 27 нуклеотидов, примерно от 28 нуклеотидов, примерно от 29 нуклеотидов и примерно от 30 нуклеотидов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи включает модификацию, которая приводит к тому, что агент РНКи обладает повышенной стабильностью в биологическом образце или во внешней среде, например, в сыворотке крови или в жидкости просвета кишечника.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи включает по меньшей мере одну модификацию каркаса молекулы сахара (например, фосфоротиоатную связь) и/или по меньшей мере один 2'-модифицированный нуклеотид. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения все пиримидины представлены 2'-О-метил-модифицированными нуклеотидами.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи включает по меньшей мере один 5'-уридин-аденин-3' (5'-ua-3') динуклеотид, в котором уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом; и/или по меньшей мере один 5'-уридин-гуанин-3' (5'-ug-3') динуклеотид, в которых 5'-уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом; и/или по меньшей мере один 5'-цитидин-аденин-3' (5'-ca-3') динуклеотид, в котором 5'-цитидин является 2'-модифицированным нуклеотидом; и/или по меньшей мере один 5'-уридин-уридин-3' (5'-uu-3') динуклеотид, в котором 5'-уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи включает 2'-модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-дезоксидеокси, 2'-дезоксидеокси-2'-фтор, 2'-О-метил, 2'-О-метоксиэтил (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропил (2'-О-АР), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил (2'-О-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-О-DMAEOE) и 2'-О-N-метилацетиламино (2'-О-NMA).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи включает тупой конец.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи включает выступ из 1-4 неспаренных нуклеотидов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи включает выступ с 3'-конца антисмысловой цепи агента РНКи.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи лигирован с одним или несколькими диагностическими соединениями, репортерной группой, агентом перекрестного связывания, частью молекулы, определяющей резистентность к нуклеазе, природным или необычным нуклеиновым основанием, липофильной молекулой, холестеринем, липидом, лектином, стероидом, увалом, гецигенином, диосгенином, терпеном, тритерпеном, сарсапогенином, фрайделином, дериватизированной эпифрайделанолом литохалиевой кислотой, витамином, углеводом, декстраном, пуллуланом, хитином, хитозаном, синтетическим углеводом, 15-мерным олиголактатом, природным полимером, низкомолекулярным полимером или полимером средней молекулярной массы, инулином, циклодекстрином, гиалуроновой кислотой, белком, белок-связывающим агентом, интегрин-нацеливающей молекулой, поликатионным агентом, пептидом, полиамином, пептидным миметиком и/или трансферинем.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи способен ингибировать экспрессию гена Beta-ENaC по меньшей мере примерно на 60% в концентрации 10 нМ в клетках H441 *in vitro*.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи способен ингибировать экспрессию гена Beta-ENaC по меньшей мере примерно на 70% в концентрации 10 нМ в клетках H441 *in vitro*.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи способен ингибировать экспрессию гена Beta-ENaC по меньшей мере примерно на 80% в концентрации 10 нМ в клетках H441 *in vitro*.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи способен ингибировать экспрессию гена Beta-ENaC по меньшей мере примерно на 90% в концентрации 10 нМ в клетках H441 *in vitro*.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения величина EC50 агента РНКи составляет не более примерно 0,1 нМ.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения величина EC50 агента РНКи составляет не более примерно 0,01 нМ.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения величина EC50 агента РНКи составляет не более примерно 0,001 нМ.

Способ лечения с применением агента РНКи, описанного в настоящем изобретении.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к способу лечения у индивидуума заболевания, связанного с Beta-ENaC, который включает стадию введения индивидууму терапевтически эффективного количества композиции, содержащей агент РНКи, содержащий по меньшей мере антисмысловую цепь, причем антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи агента РНКи к Beta-ENaC, выбранного из специфических дуплексов, предусмотренных в настоящем изобретении и перечисленных, например, в табл. 1. В другом варианте осуществления настоящего изобретения относится к способу, согласно которому композиция, включающая агент РНКи, дополнительно включает смысловую цепь, причем смысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от смысловой цепи агента РНКи к Beta-ENaC, выбранного из специфических дуплексов, предусмотренных в настоящем изобретении и перечисленных, например, в табл. 1.

Различные варианты осуществления настоящего изобретения описаны ниже.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения заболеваниями, связанными с Beta-ENaC, являются муковисцидоз, псевдогипоальдостеронизм типа 1 (ПГА1), синдром Лиддла, гипертензия, алкалоз, гипокалиемия и/или гипертензия, связанная с ожирением.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения заболеванием, связанным с Beta-ENaC, является муковисцидоз.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ дополнительно предусматривает проведение дополнительного лечения. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения дополнительным лечением является терапевтически эффективное количество композиции.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения дополнительным лечением является методика (или процедура).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения дополнительное лечение и агент РНКи могут применяться в каком-либо порядке или одновременно.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает стадию проведения дополнительного лечения муковисцидоза, псевдогипоальдостеронизма типа 1 (ПГА1), синдрома Лиддла, гипертонии, алкалоза, гипокалиемии и/или гипертонии, связанной с ожирением.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает стадию проведения дополнительного лечения или лечения в виде применения средства, выбранного из перечня, который включает дополнительный агонист к ЕNaС, калийсберегающее мочегонное средство, амилорид, триамтерин, регуляцию потребления пищевой соли, антибиотики, терапию ДНазой, альбутерол, N-ацетилцистеин, дыхательную терапию, перкуссионную терапию и занятия аэробикой.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения композиция включает второй агент РНКи к Beta-ENaC. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения второй агент РНКи физически отделен от первого, два агента физически контактируют (например, ковалентно связаны или объединены иным образом).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает стадию введения дополнительного агента РНКи, который содержит по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи агента РНКи к Beta-ENaC, выбранной из специфических дуплексов, предусмотренных в настоящем изобретении и перечисленных, например, в табл. 1.

Способ подавления экспрессии Beta-ENaC с применением описанных в настоящем изобретении агентов РНКи.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к способу подавления экспрессии гена Beta-ENaC у индивидуума, включающему стадию введения индивидууму терапевтически эффективного количества композиции, содержащей агент РНКи по настоящему описанию. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи включает по меньшей мере антисмысловую цепь и/или включает смысловую и антисмысловую цепи, причем антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи агента РНКи к Beta-ENaC, выбранной из тех специфических дуплексов, предусмотренных в настоящем изобретении и перечисленных, например, в табл. 1.

Различные варианты данного объекта настоящего изобретения описаны ниже.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения у индивидуума имеется заболевание, связанное с Beta-ENaC, или индивидуум чувствителен к этому заболеванию.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения заболеванием, связанным с Beta-ENaC, является муковисцидоз, псевдогипоальдостеронизм типа 1 (ПГА1), синдром Лиддла, гипертония, алкалоз, гипокалиемия и/или гипертония, связанная с ожирением.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения заболеванием, связанным с Beta-ENaC, является муковисцидоз

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ дополнительно предусматривает проведение дополнительного лечения. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения дополнительным лечением является терапевтически эффективное количество композиции.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения дополнительным лечением является методика (или процедура).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения дополнительное лечение и агент РНКи могут применяться в каком-либо порядке или одновременно.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения дополнительное лечение и агент РНКи могут проводиться в каком-либо порядке или одновременно.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает стадию проведения дополнительного лечения муковисцидоза, псевдогипоальдостеронизма типа 1 (ПГА1), синдрома Лиддла, гипертонии, алкалоза, гипокалиемии и/или гипертонии, связанной с ожирением.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает стадию проведения дополнительного лечения или лечения в виде применения средства, выбранного из перечня, который включает дополнительный агонист к ЕNaС, калийсберегающее мочегонное средство, амилорид, триамтерин, регуляцию потребления пищевой соли, антибиотики, терапию ДНазой, альбутерол, N-ацетилцистеин, дыхательную терапию, перкуссионную терапию и занятия аэробикой.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения композиция включает второй агент РНКи к Beta-ENaC. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения второй агент РНКи физически отделен от первого, два агента физически контактируют (например, ковалентно связаны или объединены иным образом).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает стадию введения дополнительного агента РНКи, который содержит по меньшей мере 15 последователь-

но расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи агента РНК к Beta-ENaC, выбранной из специфических дуплексов, предусмотренных в настоящем изобретении и перечисленных, например, в табл. 1.

Фармацевтические составы агента РНК к Beta-ENaC.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение связано с композицией, включающей агент РНК по настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНК включает по меньшей мере антисмысловую цепь и/или включает смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами из антисмысловой цепи агента РНК к Beta-ENaC, выбранного из специфических дуплексов, предусмотренных в настоящем изобретении и перечисленных, например, в табл. 1, причем композиция является фармацевтически эффективным составом.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают применение агента РНК для получения лекарственного средства для лечения заболевания, связанного с Beta-ENaC, причем агент РНК включает смысловую цепь и антисмысловую цепь, и антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами из антисмысловой цепи агента РНК к Beta-ENaC, выбранного из специфических дуплексов, предусмотренных в настоящем изобретении и перечисленных, например, в табл. 1.

ENaC.

Обозначение "ENaC" означает эпителиальный натриевый канал (epithelial sodium channel - ENaC) - и мембранный белок, составленный из трех разных, но гомологичных субъединиц (альфа, бета и гамма).

ENaC содержится в апикальной мембране эпителиальных клеток дистальных нефронов (кортикальных и медуллярных прямых почечных канальцев) и дистального отдела ободочной кишки, а также в дыхательных путях и в выводных протоках некоторых желез. ENaC также экспрессируется в плаценте, мозге и мочевом пузыре. ENaC обеспечивает контролируемый метаболический путь поступления Na^+ из просвета указанных органов в эпителиальные клетки и вместе с Na^+/K^+ -АТФазой, локализованной в базолатеральной мембране тех же клеток, и отвечает за активный векторный транспорт Na^+ из внешней среды через эпителиальные клетки во внеклеточную жидкость и затем в кровь. ENaC расположен на апикальной мембране и обращен в просвет, что позволяет натрию двигаться из просвета в эпителиальные клетки. Натрий, реабсорбированный через ENaC, затем выделяется из эпителиальных клеток назад в кровяное русло под действием Na^+/K^+ -АТФазы. Реабсорбция натрия под действием ENaC сопровождается осмотическим поступлением воды для поддержания постоянной внеклеточной концентрации Na^+ . Это изменяет объем крови и в результате влияет на кровяное давление. Таким образом, ENaC играет важную роль в гомеостазе электролитов и в контроле объема крови и кровяного давления. См., например, Saxena и др., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 252, 1998, p. 208-213.

ENaC проявляет разные функциональные действия в разных органах, в которых он экспрессируется. В почках (в прямых почечных канальцах) контролируемая реабсорбция Na^+ через ENaC обеспечивает основной механизм регуляции экскреции Na^+ с мочой и таким образом позволяет точно контролировать баланс Na^+ в организме в целом под контролем гормона альдостерона. Благодаря присущему ему эффекту деполяризации потенциала на апикальной мембране Na^+ канал также обеспечивает движущую силу для тубулярной секреции K^+ .

Специфические ингибиторы ENaC индуцируют мочевую экскрецию Na^+ и ингибируют секрецию K^+ ; соответственно эти лекарственные средства (включая амилорид и триамтерен) применяют в качестве K^+ -сберегающих диуретиков. ENaC обладает сходной функциональной ролью в дистальном отделе ободочной кишки, предупреждая чрезмерную потерю Na^+ с экскрементами. В воздушных путях важную роль представляет реабсорбция жидкости, которая наполняет воздушные пути при дыхании, индуцируя сдвиг с секреции жидкости (до дыхания) к реабсорбции жидкости (постнатальной).

Вместе с регулятором трансмембранной проводимости при муковисцидозе (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator - CFTR) он также участвует в тонкой регуляции баланса жидкости в воздушных путях, что поддерживает тонкую пленку слизи, необходимую для очищения слизи. В выделительных протоках слюнных и потовых желез действие ENaC проявляет тенденцию к снижению концентрации Na^+ в просвете, допуская экскрецию менее соленой слюны и предупреждая значительную потерю Na^+ со слюной. См., например, работу Hummler и др., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 276, 1999, p. 567-571, и приведенные в ней ссылки.

Изменения и мутации в последовательности и/или экспрессии ENaC могут привести к сверхэкспрессии или гиперактивности ENaC. Предусматриваемые в настоящем изобретении агенты РНК восстанавливают баланс по отношению к модулированной реабсорбции Na^+ за счет снижения уровня Beta-ENaC.

Beta-ENaC.

Обозначение "Beta-ENaC" означает ген или белок бета-субъединицы амилорид-чувствительного натриевого канала (или какую-либо нуклеиновую кислоту, кодирующую этот белок), которая может называться по-разному: натриевый канал, потенциал-независимый канал 1, бета; SCNN1B; bENaC; ENaCb;

ENaC-beta; SCNEB или β -ENaC. К дополнительным идентификаторам относятся OMIM: 600760; MGI: 104696; HomoloGene: 284 и GeneCards: SCNN1B. С дополнительной информацией можно ознакомиться в Human: Entrez 6338; Ensembl ENSG00000168447; UniProt P51168; RefSeq (mRNA) NM_000336; RefSeq (protein) NP_000327; Location (UCSC), Chr 16: 23.22-23.3 Mb. Mouse: Entrez 20277; Ensembl ENSMUSG00000030873; UniProt Q3TP51; RefSeq (mRNA) NM_011325 RefSeq (protein) NP_035455; Location (UCSC), Chr 7: 121.66-121.71 Mb.

Аминокислотная последовательность Beta-ENaC человека описана в работе Saxena и др., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 252, 1998, p. 208-213.

Функциональные домены Beta-ENaC были очерчены. Этот белок имеет внутриклеточный N-концевой домен (аминокислоты с 1 по 50), первый трансмембранный домен (аминокислоты с 51 по 71), внеклеточную петлю (аминокислоты с 72 по 533), второй трансмембранный домен (аминокислоты с 534 по 553) и C-концевой внутриклеточный домен (аминокислоты с 554 по 640).

C-концевой внутриклеточный домен содержит две области, в которых мутации связаны с синдромом Лиддла и другими заболеваниями: в области аминокислот с 564 по 595 и мотиве "PY" (с аминокислотной консенсусной последовательностью PPXY по аминокислотам с 615 по 618). См., например, Saxena и др., 1998.

Агент РНКи Beta-ENaC по настоящему изобретению может взаимодействовать с частью иРНК, соответствующей специфическому функциональному домену или доменам Beta-ENaC. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения агенты РНКи по настоящему изобретению специфически связываются с иРНК Beta-ENaC в последовательности, соответствующей функциональному домену, например в N-концевом внутриклеточном домене, в первом трансмембранном домене, во внеклеточной петле, во втором трансмембранном домене или в C-концевом внутриклеточном домене, или, более конкретно, в области аминокислот с 564 по 595, или в мотиве PY (аминокислоты с 615 по 618).

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения агенты РНКи по настоящему изобретению связываются с 5' или 3' UTR (т.е. с нетранслируемой областью (областями)).

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения агенты РНКи по настоящему изобретению описывают связывание с иРНК Beta-ENaC, но не в последовательности, соответствующей определенному функциональному домену, например не в N-концевом внутриклеточном домене, не в первом трансмембранном домене, не во внеклеточной петле, не во втором трансмембранном домене, или не в

C-концевом внутриклеточном домене, или, более конкретно, не в области аминокислот с 564 по 595, или в мотиве PY (аминокислоты с 615 по 618).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения связывание агента РНКи с определенной областью иРНК Beta-ENaC приводит к пониженной экспрессии, уровню и/или действию Beta-ENaC.

Эффективность агента РНКи в снижении уровня Beta-ENaC может быть измерена непосредственно, например, путем измерения уровней нагрузки иРНК Beta-ENaC или уровней самого белка. В другом варианте эффективность РНКи может быть измерена опосредованно путем измерения уровня какой-либо одной или нескольких из известных активностей Beta-ENaC или путем измерения изменений в активностях компонентов метаболического пути, расположенных ниже Beta-ENaC.

Главное действие белка заключается в формировании наряду с Alpha-ENaC и Gamma-ENaC и, возможно иногда, Delta-ENaC, натриевого канала ENaC. Beta-ENaC, Gamma-ENaC и Delta-ENaC также могут формировать определенный тип канала, описанный в поджелудочной железе, яичках и яичниках. Также было показано, что Beta-ENaC взаимодействует с WWP2 и NEDD4. См., например, McDonald и др., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283(3), 2002, p. F431-6; Harvey и др., *J. Biol. Chem.* 276(11), 2001, p. 8597-601; Fagg и др., *Biochem. J.* 345(3), 2000, p. 503-509. Действие Beta-ENaC может быть измерено, например, по способности связывать и формировать функциональные единицы вместе с такими другими биологическими компонентами. Эффективность агента РНКи также может быть измерена косвенно путем измерения количества поверхностной жидкости на слизистых мембранах и за счет гистологических исследований тканей, экспрессирующих Beta-ENaC.

Последовательности Beta-ENaC у разных видов.

Специфический к Beta-ENaC агент РНКи может быть сконструирован таким образом, что его последовательность полностью соответствует последовательности иРНК, соответствующей гену Beta-ENaC человека и гомологичному гену исследуемого животного. Таким образом, точно соответствующий агент РНКи может применяться для исследуемых животных (например, для крыс, мышей, макак-крабоедов и др.) и для людей. Последовательности различных генов ENaC были определены у многих видов, в том числе у людей, мышей, крыс, коров и кур, согласно описанному, наряду с другими работами, в публикациях Garty и др., *Physiol. Rev.* 77, 1997, p. 359-396; и Ahn и др., *Am. J. Physiol.* 277, 1999, p. F121-F129.

Бала определена последовательность Beta-ENaC у макаки-крабоеда (*Macaca fascicularis*, или "суно").

Выравнивание последовательностей иРНК Beta-ENaC суно (SEQ ID NO: 221) и иРНК Beta-ENaC человека (human) (SEQ ID NO: 222) показано ниже.

034363

```

Cyno Beta-ENaC -----
Human Beta-ENaC GTGCTTCCCCGCCCTGAACCTGCTCCCTCCCAGTCGGTCTCGCCGCGCT 50

Cyno Beta-ENaC -----GGTACCCAGCTTGCT 15
Human Beta-ENaC CGCCGGGTGTCCCAGTGTCAACCAACTCGGCCGCCGCCAGCTTGCC 100
                *      *
                *      *

Cyno Beta-ENaC TGTTCTTTTGCAGAAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCAGATCAAT 65
Human Beta-ENaC GCGCACCGCCGCTCCGCCACCGCCGACAGCGCGCATCCTCCGTGTCCCC 150
                **  **      * * * * * * * *
                * * * * *

Cyno Beta-ENaC TCCCCGGGGATCCGA-ATTCGCCACCAATGCACGTGAAGAAGTACCTGCTG 114
Human Beta-ENaC GCTCCGCCGCCCGAGCAGGTGCCACTATGCACGTGAAGAAGTACCTGCTG 200
                *  ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                * * * * *

Cyno Beta-ENaC AAGTGCCTGCACCGGCTGCAGAAGGGCCCCGGCTACACGTACAAGGAGCT 164
Human Beta-ENaC AAGGGCCTGCATCGGCTGCAGAAGGGCCCCGGCTACACGTACAAGGAGCT 250
                ***  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                * * * * *

Cyno Beta-ENaC GCTGGTGTGGTACTGCGATAACACCAACACCCACGGCCCCAAGCGTATCA 214
Human Beta-ENaC GCTGGTGTGGTACTGCGACAACACCAACACCCACGGCCCCAAGCGCATCA 300
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                * * * * *

Cyno Beta-ENaC TCTGCGAGGGGCCCAAGAAGAAAGCCGTGTGGTTCCTGCTCACCCCTGCTC 264

```

Human Beta-ENaC TCTGTGAGGGGCCCCAAGAAGAAAGCCATGTGGTTCCTGCTCACCCCTGCTC 350

Cyno Beta-ENaC TTCCTGCTCTCGTCTGCTGGCAGTGGGGCATCTTCATCAGGACCTACTT 314
Human Beta-ENaC TTCGCCGCCCTCGTCTGCTGGCAGTGGGGCATCTTCATCAGGACCTACTT 400
*** ** *****

Cyno Beta-ENaC GAGCTGGGAGGTCAGCGTCTCCCTCTCCGTAGGCTTCAAGACCATGGACT 364
Human Beta-ENaC GAGCTGGGAGGTCAGCGTCTCCCTCTCCGTAGGCTTCAAGACCATGGACT 450

Cyno Beta-ENaC TCCCGCCGTCACCATCTGCAATGTAGCCCTTCAAGTATTCCAAAGTC 414
Human Beta-ENaC TCCTTGCCGTCACCATCTGCAATGTAGCCCTTCAAGTATTCCAAAATC 500

Cyno Beta-ENaC AAGCATTGCTGAAGGACCTGGATGAGCTGATGGAAGCTGTCTGGAGAG 464
Human Beta-ENaC AAGCATTGCTGAAGGACCTGGATGAGCTGATGGAAGCTGTCTGGAGAG 550

Cyno Beta-ENaC AATCCTGGCTCCTGAGCTAAGCCATGCCAATGCCACCAGGACCCTGAACT 514
Human Beta-ENaC AATCCTGGCTCCTGAGCTAAGCCATGCCAATGCCACCAGGAACCTGAACT 600

Cyno Beta-ENaC CTTCATCTGGAACCACACACCCTGGTCTTATTGATGAACGGAAACCC 564
Human Beta-ENaC TCTCATCTGGAACCACACACCCTGGTCTTATTGATGAACGGAAACCC 650

Cyno Beta-ENaC CACCACCCCATGGTCTCGATCTCTTTGGAGATAACCACAATGGCTTAAC 614
Human Beta-ENaC CACCACCCCATGGTCTCGATCTCTTTGGAGACAACCACAATGGCTTAAC 700

Cyno Beta-ENaC AAACAGCTCAGCATCAGAAAAGATCTGTAATGCCCATGGGTGCAAAATGG 664
Human Beta-ENaC AAGCAGCTCAGCATCAGAAAAGATCTGTAATGCCCAGGGGTGCAAAATGG 750
** *****

Cyno Beta-ENaC CCATGAGACTATGTAGCCTCAACGGGACCAGTGACACCTTCCGGAACTTC 714
Human Beta-ENaC CCATGAGACTATGTAGCCTCAACAGGACCAGTGACCTTCCGGAACTTC 800

Cyno Beta-ENaC ACCAGCGCTACCCAGGACGACAGAGTGGTACAGCCTGCAGGCCACCAA 764
Human Beta-ENaC ACCAGTGTACCCAGGCATTGACAGAGTGGTACATCCTGCAGGCCACCAA 850
**** *****

Cyno Beta-ENaC CATCTTTGCGCAGGTGCCGAGCAGGAGCTGGTGGAGATGAGCTACCCCG 814
Human Beta-ENaC CATCTTTGCGCAGGTGCCACAGCAGGAGCTAGTAGAGATGAGCTACCCCG 900

Cyno Beta-ENaC GCGAGCAGATGATCCTGGCCTGCCTGTTGGAGCTGAGCCCTGCAACTAC 864
Human Beta-ENaC GCGAGCAGATGATCCTGGCCTGCCTATTTCGGAGCTGAGCCCTGCAACTAC 950

Cyno Beta-ENaC CGGAACTTCACGTCCATCTTCTACCCTCACTATGGCAACTGTTACATCTT 914
Human Beta-ENaC CGGAACTTCACGTCCATCTTCTACCCTCACTATGGCAACTGTTACATCTT 1000

Cyno Beta-ENaC CAACTGGGGCATGACAGAGAAGGCACTTCCTTCGGCCAACCTGGACCTG 964
Human Beta-ENaC CAACTGGGGCATGACAGAGAAGGCACTTCCTTCGGCCAACCTGGAACTG 1050

Cyno Beta-ENaC AATTTGGCCTGAAGTTGATCCTGGACATAGGCCAGGAAGACTACGTCCCC 1014
Human Beta-ENaC AATTCGGCCTGAAGTTGATCCTGGACATAGGCCAGGAAGACTACGTCCCC 1100

Cyno Beta-ENaC TTCCTCGCTCCACGGCTGGGGTCAGGCTGATGCTTACGAGCAGAGGTC 1064
Human Beta-ENaC TTCCTCGCTCCACGGCCTGGGGTCAGGCTGATGCTTACGAGCAGAGGTC 1150

```

*****
Cyno Beta-ENaC ATACCCCTTCATCAGAGACGAGGGCATCTATGCCATGTCTGGGGACAGAGA 1114
Human Beta-ENaC ATACCCCTTCATCAGAGATGAGGGCATCTACGCCATGTCTGGGGACAGAGA 1200
*****

Cyno Beta-ENaC CGTCCATCGGGTACTCGTGGACAAGCTTCAGCGCATGGGGGAGCCCTAC 1164
Human Beta-ENaC CGTCCATCGGGTACTCGTGGACAAGCTTCAGCGCATGGGGGAGCCCTAC 1250
*****

Cyno Beta-ENaC AGCCCGTGCACCGTGAATGGCTCCGAGGTCCCGTCCAAAACCTTCTACAG 1214
Human Beta-ENaC AGCCCGTGCACCGTGAATGGTCTGAGGTCCCGTCCAAAACCTTCTACAG 1300
*****

Cyno Beta-ENaC TGACTACAACACGACCTACTCCATCCAGGCCTGTCTTCGCTCCTGCTTCC 1264
Human Beta-ENaC TGACTACAACACGACCTACTCCATCCAGGCCTGTCTTCGCTCCTGCTTCC 1350
*****

Cyno Beta-ENaC AAGACCACATGATCCGTAGCTGCAAGTGTGGGCACTACCTCTACCCACTG 1314
Human Beta-ENaC AAGACCACATGATCCGTAACTGCAACTGTGGCCACTACCTGTACCCACTG 1400
*****

Cyno Beta-ENaC CCCCCTGGGGAGAAATACTGCAACAACCGGGACTTCCCAGACTGGGCCCA 1364
Human Beta-ENaC CCCCCTGGGGAGAAATACTGCAACAACCGGGACTTCCCAGACTGGGCCCA 1450
*****

Cyno Beta-ENaC TTGCTACTCAGATCTGCAGATGAGCGTGGCGCAGAGAGACCTGCATTG 1414
Human Beta-ENaC TTGCTACTCAGATCTACAGATGAGCGTGGCGCAGAGAGACCTGCATTG 1500
*****

Cyno Beta-ENaC GCATGTGCAAGGAATCCTGCAATGACACCCAGTACAAGATGACTATCTCC 1464
Human Beta-ENaC GCATGTGCAAGGAGTCTGCAATGACACCCAGTACAAGATGACCATCTCC 1550
*****

Cyno Beta-ENaC ATGGCTGACTGGCCTTCTGAGGCCTCTGAGGACTGGATTTTCCACGTCTT 1514
Human Beta-ENaC ATGGCTGACTGGCCTTCTGAGGCCTCCGAGGACTGGATTTTCCACGTCTT 1600
*****

Cyno Beta-ENaC GTCTCAGGAGCGGGACCAAAGCACC AATATCACCCCTGAGCAGGAAGGGAA 1564
Human Beta-ENaC GTCTCAGGAGCGGGACCAAAGCACC AATATCACCCCTGAGCAGGAAGGGAA 1650
*****

Cyno Beta-ENaC TTGTCAAGCTCAACATCTACTTCCAAGAATTTAACTATCGCACCATTGAA 1614
Human Beta-ENaC TTGTCAAGCTCAACATCTACTTCCAAGAATTTAACTATCGCACCATTGAA 1700
*****

Cyno Beta-ENaC GAATCAGCAGCCAATAACCTCGTCTGGCTGCTCTCAAATCTGGGTGGCCA 1664
Human Beta-ENaC GAATCAGCAGCCAATAACATCGTCTGGCTGCTCTCGAATCTGGGTGGCCA 1750
*****

Cyno Beta-ENaC GTTTGGCTTCTGGATGGGGGGCTCTGTGCTGTGCCTCATCGAGTTTGGGG 1714
Human Beta-ENaC GTTTGGCTTCTGGATGGGGGGCTCTGTGCTGTGCCTCATCGAGTTTGGGG 1800
*****

Cyno Beta-ENaC AGATCATCATCGACTTTGTGTGGATCACCATCATCAAGCTGGTGGCCTTG 1764
Human Beta-ENaC AGATCATCATCGACTTTGTGTGGATCACCATCATCAAGCTGGTGGCCTTG 1850
*****

Cyno Beta-ENaC GCCAAGAGCCTCCGGCAGCGGGCAGCCCAAGCCAGCTACTCCGGCCCACC 1814
Human Beta-ENaC GCCAAGAGCCTACGGCAGCGGGCAGCCCAAGCCAGCTACGCTGGCCCACC 1900
*****

Cyno Beta-ENaC GCCCACGGTGGCTGAGCTGGTGGAGGCCACACCAACTTCGGCTACCAGC 1864
Human Beta-ENaC GCCCACCGTGGCCGAGCTGGTGGAGGCCACACCAACTTCGGCTACCAGC 1950
*****

```



```

Cyno Beta-ENaC  CTGACACGGCCCCCGCAGCCCCAACACCGGGCCCTACCCCAGTGAGCAG  1914
Human Beta-ENaC  CTGACACGGCCCCCGCAGCCCCAACACTGGGCCCTACCCCAGTGAGCAG  2000
*****

Cyno Beta-ENaC  GCCCTGCCCATCCCGGGCACCCCGCCCCCAACTATGACTCCCTGCGTCT  1964
Human Beta-ENaC  GCCCTGCCCATCCAGGCACCCCGCCCCCAACTATGACTCCCTGCGTCT  2050
*****

Cyno Beta-ENaC  GCAGCCACTGGACGTCATCGAGTCTGACAGTGAGGGTGATGCCATCTAA-  2013
Human Beta-ENaC  GCAGCCGCTGGACGTCATCGAGTCTGACAGTGAGGGTGATGCCATCTAAC  2100
*****

Cyno Beta-ENaC  ---GCGGCCGCTAG---AAATAGCTTGATCTGGTTA---CCACTAAACCA  2055
Human Beta-ENaC  CCTGCCCTGCCACCCCGGGCGGCTGAAACTCACTGAGCAGCCAAGACT  2150
* * * * *

Cyno Beta-ENaC  GC--CTCAAGAACAC-CCGAATGGAGTCTCT---AAGTACATAATACC  2098
Human Beta-ENaC  GTTGCCCGAGGCCTCACTGTATGGTGCCTCTCCAAAGGGTGGGAGGGT  2200
* * * * *

Cyno Beta-ENaC  AACTTACACTTTACAAAATGTTGTCCCCCAA-AATGTAGCCATTCTGATC  2147
Human Beta-ENaC  AGCTCTCCAGGCCAGAGCTTGTGTCTTCAACAGAGAGGCCAGCGGCAAC  2250
* * * * *

Cyno Beta-ENaC  TGCTCCTAATAAAAAAGAAAGTTTCTTACATTTAAAAAATAAAAAAAAA  2197
Human Beta-ENaC  TGGTCCGTTACTGGCCAAGGGCTCTGTAGATACCGGTGCTGGTACAGGA  2300
** ***

Cyno Beta-ENaC  AAAAAAAAAAAAAAAAAACCCCCCC--CCCCCCCCCTGCAGAGATCTG  2245
Human Beta-ENaC  TGCAGGAATAAATGTATCTTACCTGGTTCCTACCTCGTCCCTACCTG  2350
* * * * *

Cyno Beta-ENaC  CTAGCTTGAGTATTCTATAGAGTACACCTAAATACT-----  2280
Human Beta-ENaC  TCCTGATCCTGGTCTGAAGACCCCTCGGAACACCTCTCCTGGTGGCAG  2400
* * * * *

Cyno Beta-ENaC  -----  2450
Human Beta-ENaC  GCCACTTCCCTCCAGTGCCAGTCTCCATCCACCCAGAGAGGAACAGGC

Cyno Beta-ENaC  -----  2500
Human Beta-ENaC  GGGTGGGCCATGTGGTTTTCTCCTTCTGGCCTTGGCTGGCCTCTGGGG

Cyno Beta-ENaC  -----  2550
Human Beta-ENaC  AGGGGTGGTGGAGAGATGGAAGGGCATCAGGTGTAGGGACCCCTGCCAAGT

Cyno Beta-ENaC  -----  2597
Human Beta-ENaC  GGCACCTGATTTACTCTAGAAAATAAAAGTAGAAAATACTGAGTCCA

Cyno Beta-ENaC  (SEQ ID NO: 221)
Human Beta-ENaC  (SEQ ID NO: 222)

```

Стартовый кодон (ATG) и стоп-кодон (TAA) последовательностей супо и human подчеркнуты. Выравнивание нуклеотидов между последовательностями human и супо отмечены звездочкой (*).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи Beta-ENaC по настоящему изобретению включают последовательности, идентичную иРНК Beta-ENaC человека, крысы и супо. Идентичность последовательности облегчает тестирование животных перед тестированием человека. В другом варианте осуществления настоящего изобретения агент РНКи Beta-ENaC включает последовательность, идентичную иРНК Beta-ENaC человека, крысы и супо.

Дополнительные варианты осуществления агента РНКи к Beta-ENaC.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи Beta-ENaC включает последовательность, которая не спаривается с какой-либо другой последовательностью иРНК или гена. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи Beta-ENaC включает последовательность, которая отличается от всех других известных иРНК или генов, не относящихся к Beta-ENaC, по меньшей мере 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи Beta-ENaC по настоящему изобретению вводят пациенту, нуждающемуся в этом (например, пациенту, больному муковисцидозом, псевдогипоальдостеронизмом типа 1 (ПГА1), синдромом Лиддла, гипертонией, алкалозом, гипокалиемией и гипертонией, связанной с ожирением).

Пациенту также может быть введено более одного агента РНКи, специфичного в отношении Beta-ENaC. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент (агенты) РНКи Beta-ENaC по настоящему изобретению может необязательно вводиться наряду с одним или несколькими дополнительными фармацевтическими агентами, соответствующими данному заболеванию. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент (агенты) РНКи Beta-ENaC по настоящему изобретению могут быть необязательно введен(ы) наряду с проведением какого-либо другого соответствующего дополнительного лечения, причем дополнительное лечение может представлять композицию или способ.

В случае муковисцидоза, псевдогипоальдостеронизма типа 1, синдрома Лиддла, гипертонии, алкалоза, гипокалиемии и/или гипертонии, связанной с ожирением, агент (агенты) РНКи и дополнительное средство (средства) лечения могут вводиться в любом порядке, одновременно или последовательно, в

виде одной или многих доз на протяжении определенного времени.

Определения

Для удобства ниже приводятся определенные термины и фразы, используемые в настоящем описании. Если имеется очевидное расхождение с применением понятия в других разделах настоящего описания и его определением, предусмотренным в этом разделе, превагирует определение, используемое в данном разделе.

Агент РНКи.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к агенту РНКи Beta-ENaC или к композиции, включающей, по меньшей мере, последовательность антисмысловой нуклеиновой кислоты, комплементарной нуклеиновой кислоте Beta-ENaC (или их части), или относятся к рекомбинантному вектору экспрессии, кодирующему миРНК, или к композиции, включающей антисмысловую нуклеиновую кислоту, которая может функционировать в качестве РНКи, согласно указанному ниже. В настоящем изобретении понятие "антисмысловая" нуклеиновая кислота означает нуклеотидную последовательность, комплементарную "смысловой" нуклеиновой кислоте, кодирующей белок Beta-ENaC (например, комплементарную кодирующей цепи двухцепочечной ДНК, комплементарной иРНК или комплементарной кодирующей цепи гена Beta-ENaC или нуклеиновой кислоте).

В контексте настоящего изобретения понятия "агент РНКи к Beta-ENaC", "агент иРНК к Beta-ENaC", "миРНК к Beta-ENaC", "миРНК Beta-ENaC" и другие относятся к миРНК (малой ингибирующей РНК), кшРНК (короткой или малой шпилечной РНК), агенту иРНК (агенту интерферирующей РНК), агенту РНКи (агенту РНК-интерференции), дцРНК (двухцепочечной РНК), микроРНК и другим агентам и относятся к композиции, которая специфически нацеливается, специфически относится и/или связывается с иРНК Beta-ENaC. В контексте настоящего изобретения понятия "антисмысловая нуклеиновая кислота" или "композиция, включающая антисмысловую нуклеиновую кислоту" и им подобные имеют широкое значение и относятся к какой-либо композиции, включающей по меньшей мере одну цепь нуклеиновой кислоты, которая является антисмысловой по отношению к соответствующей мишени; к этим понятиям относятся, но ими перечень не ограничивается, какие-либо миРНК, кшРНК, иРНК, дцРНК, микроРНК, антисмысловой олигонуклеотид и какая-либо другая композиция, включающая антисмысловую нуклеиновую кислоту. В контексте настоящего изобретения обозначения "иРНК" и "РНКи" относятся к агенту, который содержит РНК (или ее производное) и который опосредует направленное расщепление другого транскрипта РНК по метаболическому пути через комплекс RISC (RNA-induced silencing complex - заглушающий комплекс, индуцированный РНК). В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агентом РНКи является олигонуклеотидная композиция, которая активирует комплекс/метаболический путь RISC. В другом варианте осуществления настоящего изобретения агент РНКи включает последовательность антисмысловой цепи (антисмысловой олигонуклеотид).

Агент (агенты) РНКи по настоящему изобретению нацеливаются (например, связываются, отжигаются и т.д.) с иРНК Beta-ENaC. Применение агента РНКи, специфичного в отношении Beta-ENaC, приводит к снижению действия, уровня и/или экспрессии Beta-ENaC, например, к "нокдауну" или "нокауту" гена-мишени или целевой последовательности. В частности, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения в случае болезненного состояния, отличающегося сверхэкспрессией или гиперактивностью Beta-ENaC, введение агента РНКи к Beta-ENaC приводит к нокдауну мишени Beta-ENaC, достаточному для восстановления нормального уровня активности Beta-ENaC и/или нормального уровня реабсорбции Na^+ .

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения РНКи представляет единственную цепь (например, кшРНК, описанную в настоящем изобретении).

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения одна или обе цепи имеют однонитевые разрывы (ники).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения олигонуклеотид или полинуклеотид агента одноцепочечной РНКи может включать смысловую и/или антисмысловую цепь. См., например, статью Sioud, J. Mol. Biol., 348, 2005, p. 1079-1090, и приведенные в ней ссылки на литературу. Таким образом, настоящее описание охватывает агенты РНКи с одной цепью, включающей или смысловую, или антисмысловую цепь агента РНКи, описанного в настоящем изобретении.

К миРНК, которые особенно применимы для настоящего описания, относятся те агенты, которые могут специфически связываться с областью иРНК Beta-ENaC и обладают одним или несколькими из следующих признаков: связыванием в кодирующем сегменте Beta-ENaC; связыванием по месту соединения 5'-нетранслируемой области и начала кодирующего сегмента или около этого места; связыванием по месту начала трансляции иРНК или около этого места; связыванием по месту соединения экзонов и интронов, через него или около него; связыванием с молекулами иРНК или транскриптами других генов, которое незначительно или отсутствует (незначительно или нет "эффектов вне мишени"); связыванием с иРНК Beta-ENaC в области (областях) или около области (областей), которые не являются двухцепочечными или ствольными областями, например, в петле или одноцепочечном участке; индукцией незначительной иммуногенности или отсутствием такой индукции; связыванием в сегменте последовательности иРНК Beta-ENaC, консервативным у животных разных видов (в том числе у человека, мыши, крысы, ма-

каки-крабоеда и др.), причем наличие консервативной последовательности облегчает тестирование и применение различных лабораторных животных; связыванием с двухцепочечной областью (областями) иРНК; связыванием с областью с высоким содержанием АТ (например, по меньшей мере примерно с 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60% АТ) и/или отсутствием определенных последовательностей, предположительно снижающих действие миРНК, или о которых известно, что они снижают действие миРНК, например, наличием последовательности GG с 5'-конца, который может снижать разделение двухцепочечной части миРНК. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи, специфичный к Beta-ENaC, может быть двухцепочечной РНК, обладающей одним или несколькими из указанных свойств.

Понятие "двухцепочечная РНК" или "дцРНК" в контексте настоящего изобретения относится к агенту РНКи, включающему первую и вторую цепи; например, композиция, которая включает молекулу РНК или комплекс молекул, имеющих гибридизируемую дуплексную область (т.е. область, в которой основания нуклеотидов из первой цепи и второй цепи спарены), которая включает две антипараллельные и в существенной степени комплементарные цепочки нуклеиновых кислот, которые могут иметь "смысловую" и "антисмысловую" ориентации по отношению к целевой РНК. Антисмысловую цепь, касающуюся мишени иРНК, также называют "ведущей цепью", а смысловую цепь также называют "цепью-пассажем". Цепь-пассаж может обладать по меньшей мере одним или несколькими из следующих признаков: одним или несколькими дополнительными нуклеотидами (например, выступом или петлей из 1 нуклеотида) по сравнению с другой цепью, ником, гэпом и др. по сравнению с другой цепью. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения агент РНКи включает первую цепь и вторую цепь. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения первая цепь является смысловой цепью и вторая цепь является антисмысловой цепью. В других вариантах осуществления настоящего изобретения первая цепь является антисмысловой цепью, а вторая цепь смысловой цепью.

Дуплексная область может быть какой-либо длины, которая позволяет специфически разрушать требуемую целевую РНК по метаболическому пути RISC, но обычно может варьировать в длину в диапазоне 9-36 пар оснований (п.о.), например может иметь 15-30 п.о. в длину. Соответствующий дуплекс размером от 9 до 36 п.о. может быть любой длины в указанном диапазоне, например состоять из 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 п.о., и может находиться в каком-либо поддиапазоне в заданном диапазоне, включая, но ими не ограничиваясь, 15-30, 15-26, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-26, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-26, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 19, 20-30, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 20, 21-30, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, 21-22, 21, 22 или 23 п.о. В клетке вырабатываются дцРНК путем процессинга с участием Dicer и сходных ферментов, и они обычно находятся в диапазоне примерно от 19 до примерно 22 п.о. в длину. Одна цепь области дуплекса дцРНК включает последовательность, которая в существенной степени комплементарна области целевой РНК. Две цепи, образующие структуру дуплекса, могут происходить от одной молекулы РНК, имеющей по меньшей мере одну самокомплементарную область дуплекса или может быть сформирована из двух или нескольких отдельных молекул РНК, которые гибридизируются с формированием дуплекса. Если область дуплекса сформирована из двух самокомплементарных областей одной молекулы, молекула может иметь область дуплекса, отделенную однонитевой цепью нуклеотидов (в настоящем изобретении называемой "шпилькой петлей", например, имеющейся в конструкции кшРНК) между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, формируя структуру дуплекса. Шпилька может включать по меньшей мере один неспаренный нуклеотид; в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения петля шпильки может включать по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 23 или более неспаренных нуклеотидов. Если две в существенной степени комплементарные цепи в дцРНК включены в разные молекулы РНК, эти молекулы необязательно, но могут быть ковалентно соединены. Если две цепи соединяются ковалентно с помощью шпильки петлей, в настоящем изобретении конструкцию обычно обозначают "кшРНК". Если две цепи соединяются ковалентно не с помощью шпильки, а иным образом, связующая структура называется "линкером".

РНК-интерференция.

РНК-интерференция (РНКи) - посттрансляционный направленный метод сайленсинга генов, в котором используют двухцепочечную РНК (дцРНК) для разрушения информационной РНК (иРНК), содержащей ту же последовательность, что и дцРНК. Процесс РНКи происходит в том случае, когда рибонуклеаза III (Dicer) расщепляет более длинную дцРНК на более короткие фрагменты, называемые миРНК. Молекулы миРНК (малые интерферирующие РНК) обычно составляют в длину примерно 21-23 нуклеотида и содержат дуплексы примерно из 19 пар оснований. Более короткие сегменты РНК затем опосредуют разрушение целевой иРНК. Dicer также вовлечен в вырезание малых временных РНК (мвРНК), размером 21 и 22 нуклеотида, из РНК-предшественника консервативной структуры, которые участвуют в контроле транскрипции. Hutvagner и др., Science, 293, 2001, p. 834. РНКи ответ также отличается эндонуклеазным комплексом, обычно называемым комплексом RISC (RNA-induced silencing complex - заглушающий комплекс, индуцированный РНК), который опосредует расщепление одноцепочечной

чечной иРНК, комплементарной антисмысловой цепи миРНК. Расщепление целевой РНК происходит в середине области, комплементарной антисмысловой цепи дуплекса миРНК.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНК-интерференции включает одноцепочечную РНК, которая взаимодействует с последовательностью РНК-мишени, для направления расщепления РНК-мишени. Не опираясь на какую-либо теорию, полагают, что длинная двухцепочечная РНК, интродуцированная в растительные клетки и клетки беспозвоночных, разрушается на миРНК эндонуклеазой типа III, называемой Dicer (Sharp и др., *Genes Dev.* 2001, 15, p. 485). Dicer, фермент рибонуклеаза типа III, перерабатывает дцРНК в короткие интерферирующие РНК из 19-23 пар оснований, которым свойственны выступы из двух оснований с 3'-конца (Bernstein и др., *Nature* 409, 2001, p. 363). Затем молекулы миРНК инкорпорируют в заглушающий комплекс, индуцированный РНК (RISC), в котором одна или несколько геликаз раскручивают дуплекс миРНК, в результате чего одна из неспаренных в настоящее время цепей миРНК действует в качестве "направляющей" цепи для распознавания мишени (Nykanen и др., *Cell* 107, 2001, p. 309). При связывании антисмысловой направляющей цепи с соответствующей целевой иРНК одна или несколько эндонуклеаз в комплексе RISC расщепляет мишень для индукции сайленсинга (Elbashir и др., *Genes Dev.*, 15, 2001, p. 188). Таким образом, один из объектов настоящего изобретения относится к одноцепочечной РНК, которая индуцирует формирование комплекса RISC, чтобы вызвать эффект сайленсинга гена-мишени.

РНК-интерференция также была изучена в различных системах. Работа с эмбриональными лизатами *Drosophila* (Elbashir и др., *EMBO J.*, 20, 2001, p. 6877 и WO 01/75164) выявила определенные потребности в длине, структуре, химической композиции и последовательности миРНК, которые важны для опосредования эффективного действия РНКи в разных системах, включая млекопитающих. Такие исследования показали, что дуплексы миРНК из 21 нуклеотида наиболее активны, если содержат 3'-концевые динуклеотидные выступы. Допускалось замещение 3'-концевых нуклеотидов миРНК на 2'-дезоксинуклеотиды (2'-Н). Кроме того, 5'-фосфат на мишень-комплементарной цепи дуплекса миРНК обычно необходим для действия миРНК. Наиболее важно для терапевтического применения, что дуплексы миРНК короче 50 п.о. или примерно такого размера не активируют ответ в виде интерферона в клетках млекопитающих. См., например, WO 01/752164.

Таким образом, молекулы дцРНК (агенты РНКи), описанные в настоящем изобретении, применимы в РНК-интерференции Beta-ENaC.

Свойства агента РНКи: смысловая цепь, антисмысловая цепь и (необязательно) выступы.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения агенты РНКи включают первую цепь и вторую цепь, например смысловую цепь и антисмысловую цепь и, необязательно, один или оба конца дуплекса, содержащие неспаренные нуклеотиды, которые в контексте настоящего изобретения называются выступами.

Понятие "антисмысловая цепь" относится к цепи агента РНКи, которая включает область, в существенной степени комплементарную последовательности-мишени. В контексте настоящего изобретения понятие "область комплементарности" относится к области в антисмысловой цепи, которая в существенной степени комплементарна последовательности, например последовательности-мишени, согласно описанному в настоящем изобретении. Если область комплементарности не полностью комплементарна последовательности-мишени, ошибочные спаривания могут быть во внутренней области или в концевых областях молекулы. В большинстве случаев наиболее устойчивые ошибочные спаривания находятся в концевых областях, например, на расстоянии 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов с 5'- и/или 3'-конца.

В контексте настоящего изобретения понятие "смысловая цепь" относится к цепи агента РНКи, которая включает область, в значительной степени комплементарную области антисмысловой цепи - понятия, смысл которого описан в настоящем изобретении.

Последовательность гена может варьировать от индивидуума к индивидууму, особенно в положениях неоднозначного соответствия в кодирующем сегменте или в нетранслируемой области; индивидуумы могут также отличаться друг от друга кодирующей последовательностью, приводя к дополнительным различиям в иРНК. Таким образом, последовательности смысловой и антисмысловой цепей агента РНКи могут быть сконструированы для соответствия агента конкретному пациенту, если это требуется. Агенты РНКи также могут быть модифицированы по последовательности для уменьшения иммуногенности, связывания с нежелательными иРНК (например, "эффекты вне мишени") или для повышения стабильности в крови. Такие варианты последовательности независимы от химической модификации оснований, или 5', или 3', или других концевых кэпов агентов РНКи.

Агенты РНКи также могут иметь выступы из 0, 1 или 2 нуклеотидов; в случае 0 выступающих нуклеотидов, агенты имеют тупые концы. Агент РНКи может иметь 0, 1 или 2 тупых конца. В "агенте РНКи с тупыми концами" обе цепи оканчиваются парой оснований; таким образом, молекула с тупыми концами утратила или 3'-, или 5'-одноцепочечные нуклеотидные выступы.

В контексте настоящего изобретения понятие "выступ" или "нуклеотидный выступ" относится по меньшей мере к одному неспаренному нуклеотиду, который выступает с конца по меньшей мере одной из двух цепей структуры дуплекса агента РНКи. Например, если 3'-конец одной цепи дцРНК простирается за пределы 5'-конца другой цепи, или наоборот, неспаренный нуклеотид (нуклеотиды) формируют

выступ. Молекула дцРНК может включать выступ, состоящий по меньшей мере из одного нуклеотида; в другом варианте выступ может включать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или более. Выступ может включать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозид, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Выступ (выступы) могут быть на смысловой цепи, антисмысловой цепи или какой-либо их комбинации. Кроме того, нуклеотид (нуклеотиды) выступа могут быть на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах или антисмысловой, или смысловой цепи дцРНК.

Агент РНКи также может необязательно включать кэп. Понятие "кэп" относится к химической части молекулы, присоединенной к концу двухцепочечного нуклеотидного дуплекса, но в контексте настоящего изобретения используется для исключения химической части молекулы, являющейся нуклеотидом или нуклеозидом. Понятие "3'-кэп" относится к кэпу, присоединенному к 3'-концу нуклеотида или олигонуклеотида. Понятие "5'-кэп" относится к кэпу, присоединенному к 5'-концу нуклеотида или олигонуклеотида. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения 3'-концевые кэпы подобны описанным, например, в WO 2005/021749 и WO 2007/128477.

Настоящее изобретение также относится к агенту РНКи, специфичному к Beta-ENaC, включающему антисмысловую цепь (которая может быть примыкающей или соединенной через линкер или петлю) в агенте РНКи. В более конкретном варианте осуществления настоящего изобретения агент РНКи включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, которые вместе представляют двухцепочечную или комплементарную область. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи также необязательно включает один или два выступа и/или один или два кэпа. Агент РНКи применяют для индукции РНК-интерференции Beta-ENaC.

Мишень и комплементарные последовательности.

Агенты РНКи по настоящему изобретению нацеливаются (например, специфически связываются, отжигаются и т.д.) на иРНК, кодирующую ген Beta-ENaC. Применение агента РНКи, специфичного по отношению к Beta-ENaC, приводит к снижению действия, уровня и/или экспрессии Beta-ENaC, например, к "нокауту" или "нокауту" гена-мишени или последовательности-мишени. В частности, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения в случае болезненного состояния, отличающегося сверхэкспрессией или гиперактивностью Beta-ENaC, введение агента РНКи к Beta-ENaC приводит к нокауту гена Beta-ENaC, что достаточно для восстановления нормального уровня действия Beta-ENaC и/или нормального уровня реабсорбции Na^+ .

В контексте настоящего изобретения понятия "последовательность-мишень" или "ген-мишень" относятся к прилегающей части нуклеотидной последовательности молекулы иРНК, сформированной при транскрипции гена, например гена Beta-ENaC, в том числе иРНК, которая является продуктом процессинга РНК основного продукта транскрипции. Часть последовательности, являющаяся мишенью, должна быть по меньшей мере такой длины, которая достаточна для того, чтобы служить субстратом для иРНК-направленного расщепления в этой части последовательности или рядом. Например, последовательность-мишень обычно может быть из 9-36 нуклеотидов в длину,

например, 15-30 нуклеотидов в длину, включая все субдиапазоны в этом интервале. Последовательность-мишень может быть из 15-30 нуклеотидов, 15-26 нуклеотидов, 15-23 нуклеотидов, 15-22 нуклеотидов, 15-21 нуклеотидов, 15-20 нуклеотидов, 15-19 нуклеотидов, 15-18 нуклеотидов, 15-17 нуклеотидов, 18-30 нуклеотидов, 18-26 нуклеотидов, 18-23 нуклеотидов, 18-22 нуклеотидов, 18-21 нуклеотида, 18-20 нуклеотидов, 19-30 нуклеотидов, 19-26 нуклеотидов, 19-23 нуклеотидов, 19-22 нуклеотидов, 19-21 нуклеотида, 19-20 нуклеотидов, 19 нуклеотидов, 20-30 нуклеотидов, 20-26 нуклеотидов, 20-25 нуклеотидов, 20-24 нуклеотидов, 20-23 нуклеотидов, 20-22 нуклеотидов, 20-21 нуклеотида, 20 нуклеотидов, 21-30 нуклеотидов, 21-26 нуклеотидов, 21-25 нуклеотидов, 21-24 нуклеотидов, 21-23 нуклеотидов, или 21-22 нуклеотидов, 21 нуклеотида, 22 нуклеотидов или 23 нуклеотидов, но этими примерами перечень не ограничивается. Смысловая и антисмысловая цепи РНКи включают последовательность, комплементарную последовательности целевой нуклеиновой кислоты, Beta-ENaC.

В контексте настоящего изобретения, если не указано иначе, понятие "комплементарность" относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, включающего первую нуклеотидную последовательность, к гибридизации и формированию дуплексной структуры в определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, включающим вторую нуклеотидную последовательность. Такие условия могут быть, например, жесткими, например 400 мМ NaCl, 40 мМ PIPES pH 6,4, 1 мМ EDTA, 50 или 70°C в течение 12-16 ч с последующей промывкой. Могут применяться другие условия, например физиологически значимые условия, которые могут встретиться вне организма. Специалист может определить набор условий, наиболее приемлемых для определения комплементарности двух последовательностей в соответствии с основным применением гибридизируемых нуклеотидов.

В контексте настоящего изобретения понятие "комплементарная" применительно к последовательности означает последовательность, которая также может включать или может быть полностью сформирована из пар оснований, не относящихся к парам Уотсона-Крика, и/или пар оснований, сформированных неприродными и модифицированными нуклеотидами, при условии, что указанные выше требования относительно их способности гибридизоваться полностью выполнены. Такие пары оснований, не от-

носящиеся к парам Уотсона-Крика, включают, но ими не ограничиваются, неоднозначную пару оснований G:U или хугстиновское спаривание оснований.

В контексте настоящего изобретения понятия "комплементарный", "полностью комплементарный" и "в существенной степени комплементарный" также могут применяться по отношению к скрещиванию оснований между смысловой цепью и антисмысловой цепью дцРНК или между смысловой цепью агента РНКи и последовательностью-мишенью, что будет понятно из контекста их применения.

В контексте настоящего изобретения полинуклеотидом, который "в существенной степени комплементарен, по меньшей мере, в отношении части" информационной РНК (иРНК), называется полинуклеотид, который в существенной степени комплементарен к смежной части по отношению к целевой иРНК (например, иРНК, кодирующей Beta-ENaC). Например, полинуклеотид комплементарен, по меньшей мере, в отношении части иРНК Beta-ENaC, если его последовательность в существенной степени комплементарна непрерывающейся части иРНК, кодирующей Beta-ENaC.

Комплементарные последовательности в агенте РНКи, например в дцРНК, согласно описанному в настоящем изобретении включают спаренные по основаниям олигонуклеотиды или полинуклеотиды, включающие первую нуклеотидную последовательность к олигонуклеотиду или полинуклеотиду, представляющему вторую нуклеотидную последовательность по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. В контексте настоящего изобретения такие последовательности могут обозначаться "полностью комплементарными" по отношению друг к другу. Однако в контексте настоящего изобретения, если первую последовательность обозначают "полностью комплементарной" по отношению ко второй последовательности, две последовательности могут быть полностью комплементарными или они могут формировать одну или несколько, но обычно не более 5, 4, 2 или 2, ошибочно спаренных пар оснований при условии гибридизации для дуплекса до 30 пар оснований, хотя сохраняется способность гибридизоваться в условиях, наиболее значимых для их окончательного применения, например подавления генной экспрессии по метаболическому пути RISC. Однако, если два олигонуклеотида сконструированы для формирования путем гибридизации одного или нескольких одноцепочечных выступов, такие выступы не следует рассматривать в качестве ошибочных спариваний в том, что касается определения комплементарности. Например, дуплекс, включающий один олигонуклеотид из 21 нуклеотида в длину и другой олигонуклеотид из 23 нуклеотидов в длину, в котором более длинный олигонуклеотид включает последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, все еще может называться "полностью комплементарной" для целей, описанных в настоящем изобретении. Понятие "выступ" означает неспаренный нуклеотид с 3'- или 5'-конца двухцепочечного нуклеотидного дуплекса согласно описанному выше. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения выступ составляет в длину 0-4 нуклеотида и располагается с 3'-конца.

Таким образом, агент РНКи по настоящему изобретению комплементарен или в существенной степени комплементарен последовательности-мишени в мишени Beta-ENaC и является двухцепочечным, включающим смысловую и антисмысловую цепи (которая может быть прилегающей, связанной петлей или иначе присоединенной), где двухцепочечная область состоит из 9-36 п. о. в длину (особенно, например, 19-22 п.о. или 19-23 п.о. в длину), и может также необязательно включать 3'- или 5'-выступ, и агент РНКи может также включать 3'-кэп. Агент РНКи опосредует РНК-интерференцию, снижает регуляцию или подавляет уровень, экспрессию и/или действие Beta-ENaC и/или создает или восстанавливает примерный нормальный уровень действия ENaC и/или Beta-ENaC или другую биологическую функцию, связанную с ENaC.

Агенты РНКи, снижающие уровень, экспрессию и/или действие Beta-ENaC.

К агентам РНКи для нацеливания на Beta-ENaC относятся те, которые связываются с последовательностью Beta-ENaC, предусмотренной в настоящем изобретении, и которые действуют, снижая Beta-ENaC по механизму РНКи. Примеры миРНК к Beta-ENaC представлены, например, в табл. 1.

Агенты РНКи по настоящему изобретению отключают, подавляют экспрессию, снижают регуляцию экспрессии и/или подавляют экспрессию гена Beta-ENaC, например, так, что достигается примерно нормальный уровень действия, экспрессии Beta-ENaC, и/или уровень, и/или реабсорбция Na⁺.

Кроме того, в различных вариантах осуществления настоящего изобретения в зависимости от состояния больного и биологического контекста допустимо применение агентов РНКи по настоящему изобретению для установки уровня экспрессии, действия Beta-ENaC и/или уровня, который ниже нормального уровня или выше нормального уровня.

Какой-либо способ, известный в данной области, может применяться для измерения изменений в действии, уровне и/или экспрессии Beta-ENaC, вызванной миРНК Beta-ENaC. Измерения могут проводиться многократно в разное время, до, во время и после введения миРНК, для определения эффекта миРНК.

Понятия "молчание", "подавление экспрессии", "снижение регуляции экспрессии", "супрессия регуляции" и др. применительно к гену Beta-ENaC означают, по меньшей мере частичное, подавление экспрессии гена Beta-ENaC, которое проявляется в виде уменьшения количества иРНК Beta-ENaC, которое может быть выделено из первой клетки или группы клеток или обнаружено в них, в которых ген Beta-ENaC транскрибируется и которые обработаны таким образом, что экспрессия гена Beta-ENaC по-

давляется, по сравнению со второй клеткой или группой клеток, в существенной степени идентичных первой клетке или группе клеток, которые не были обработаны (контрольные клетки). Степень подавления обычно выражают уравнением:

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

Уравнение 1

В другом варианте степень подавления может быть выражена в терминах снижения параметра, который функционально связан с экспрессией гена Beta-ENaC, например количества белка, кодируемого геном Beta-ENaC, изменения уровней жидкости в легких или уровней слизи и т.д. В принципе сайленсинг гена Beta-ENaC может быть определен в какой-либо клетке, экспрессирующей Beta-ENaC, или конститутивно, или путем геномного инжиниринга и каким-либо соответствующим методом. Однако, если эталонный образец или контроль необходимы для того, чтобы определить, может ли данный агент РНКи подавлять экспрессию гена Beta-ENaC до определенной степени и соответственно входить в рамки охвата настоящего изобретения, проводимые ниже в примерах исследования могут служить таким контролем.

Например, в некоторых случаях экспрессия гена Beta-ENaC супрессируется по меньшей мере примерно на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% введением агента РНКи, описанным в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ген Beta-ENaC подавляется по меньшей мере примерно на 60, 70 или 80% путем введения агента РНКи, описанного в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ген Beta-ENaC подавляется по меньшей мере примерно на 85, 90 или 95% или более введением агента РНКи согласно описанному в настоящем изобретении.

Способность агента РНКи подавлять Beta-ENaC сначала может быть исследована *in vitro* (например, используя тест-клетки, например, клетки H441).

Агенты РНКи, которые могут подавлять Beta-ENaC *in vitro*, затем могут быть исследованы на предмет иммуностимуляции, используя, например, исследование с применением МКПК (моноклеарных клеток периферической крови). Агенты РНКи также могут быть исследованы в опытах на животных. К подопытным и контрольным животным относятся те, которые повышено экспрессируют или понижено экспрессируют Beta-ENaC, согласно описанному, например, в работах Hummer и др., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 16, 2005, p. 3160-3166; Randrianarison и др., *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 294, 2007, p. 409-416; Cao и др., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2006, а также в цитируемой в этих работах литературе. Агенты РНКи, которые супрессируют или изменяют уровень, действие и/или экспрессию Beta-ENaC, могут применяться в лекарственных средствах для лечения различных заболеваний, связанных с Beta-ENaC.

Понятие "пониженное" применительно к Beta-ENaC или к симптому заболевания, связанного с Beta-ENaC, означает статистически существенное снижение уровня. Снижение может быть, например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40% или более. Если в случае определенного заболевания или в случае больного с определенным заболеванием уровни или экспрессия Beta-ENaC повышены, лечение агентом РНКи к Beta-ENaC по настоящему изобретению может существенно понизить уровень или экспрессию Beta-ENaC до уровня, рассматриваемого в литературе в качестве диапазона нормы для индивидуума, не имеющего такого заболевания. Уровень или экспрессия Beta-ENaC могут быть измерены по оценке иРНК (например, методом норзен-блоттинга или ПЦР) или белка (например, методом вестерн-блоттинга). Воздействие агента РНКи на экспрессию Beta-ENaC может быть определено путем измерения транскрипции гена Beta-ENaC (например, методом норзен-блоттинга; или с помощью полимеразной цепной реакции обратной транскриптазы или полимеразной цепной реакции реального времени (РВ-ПЦР)). РВ-ПЦР применяют, чтобы продемонстрировать, что уровни иРНК Beta-ENaC высоки в почках, поджелудочной железе и простате и имеют среднюю величину в печени и селезенке. Brauner-Osborne и др., *Biochim. Biophys. Acta*, 1518, 2001, p. 237-248. Могут быть произведены прямые исследования уровней белка Beta-ENaC (экспрессируемого на поверхности клеток), например, методом вестерн-блоттинг в тканях, в которых экспрессируется Beta-ENaC.

В контексте настоящего изобретения понятие "снижение регуляции" относится к какому-либо статистически значимому снижению биологического действия и/или экспрессии Beta-ENaC, включая полное блокирование действия (т.е. полное подавление) и/или экспрессии. Например, "снижение регуляции" может относиться к снижению по меньшей мере примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% уровня, действия и/или экспрессии Beta-ENaC.

В контексте настоящего изобретения понятия "ингибирует" или "ингибирование" Beta-ENaC относятся к какому-либо статистически значимому снижению биологического уровня, действия и/или экспрессии Beta-ENaC, включая полное блокирование действия и/или экспрессии. Например, "ингибирование" может относиться к снижению по меньшей мере примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% уровня, действия и/или экспрессии Beta-ENaC. В контексте настоящего изобретения понятие "ингибирует" сходным образом относится к существенному снижению уровня, действия и/или экспрессии,

наряду с отношением к какому-либо другому биологическому агенту или композиции.

В контексте настоящего изобретения понятие "уровень" означает, что агент РНКи Beta-ENaC может изменять уровень Beta-ENaC, например уровень иРНК Beta-ENaC, или уровень белка Beta-ENaC, или уровень действия Beta-ENaC.

Некоторые заболевания, например муковисцидоз, отличаются интенсивной ENaC-опосредованной абсорбцией Na^+ . В частности, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения в случае заболевания, отличающегося сверхэкспрессией и/или гиперактивностью Beta-ENaC, введение агента РНКи к Beta-ENaC снижает уровень, экспрессию и/или действие Beta-ENaC. Однако чрезвычайно низкие уровни Beta-ENaC также могут привести к ухудшению клиренса жидкости в легких и к почечной дисфункции. Randrianarison и др., *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 294, 2007, p. 409-416. Таким образом, в различных вариантах осуществления настоящего изобретения введение агента РНКи к Beta-ENaC в высокой степени устанавливает или восстанавливает нормальное или примерно нормальное действие, экспрессию и/или уровень Beta-ENaC.

Понятия "нормальный" или "примерно нормальный" применительно к понятиям уровня, экспрессии и/или действия означают по меньшей мере примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90%, и/или примерно 100%; и/или не более чем примерно 100%, примерно 120%, примерно 130%, примерно 140% или примерно 150% от уровня, экспрессии и/или действия Beta-ENaC в здоровых клетках, тканях или органах. Измерения могут быть произведены, используя, например, гомогенаты легких или почек, согласно описанному в работе Gambling и др., *Kidney Intl.*, 65, 2004, p. 1774-1781. В частности, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения введение соответствующего количества соответствующего агента РНКи к Beta-ENaC восстанавливает уровень, действие и/или экспрессию Beta-ENaC и/или уровни реабсорбции Na^+ примерно от 50 до примерно 150%, более предпочтительно примерно от 60 до примерно 140%, более предпочтительно примерно от 70 до примерно 130%, более предпочтительно примерно от 80 до примерно 120%, более предпочтительно примерно от 90 до примерно 110% и наиболее предпочтительно примерно от 100% от показателей здоровых клеток, тканей или органов. Уровень действия Beta-ENaC также может быть косвенным образом измерен по балансу жидкости в легких. Баланс жидкости в легких может быть оценен путем подсчета кровопотери, соотношения сухой/влажной массы легкого, которые являются показателем количества внесосудистой жидкости в легких. Randrianarison и др., *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 294, 2007, p. 409-416. Уровень действия Beta-ENaC также может быть косвенным образом измерен гистологическими методами исследования легких, в частности бронхов, альвеолярных ходов и кровеносных сосудов. Randrianarison и др. 2007; Zhou и др., *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 178, 2008, p. 1245-1256. Введение РНКи к Beta-ENaC пациенту с заболеванием, связанным с Beta-ENaC, таким образом, эффективно восстанавливает уровень, действие и/или экспрессию Beta-ENaC и уровень реабсорбции Na^+ примерно до нормального уровня, который определяют прямым измерением уровней иРНК или белка Beta-ENaC или косвенным определением, например анализом гистологических образцов или уровней жидкости в легких.

Кроме того, в различных вариантах осуществления настоящего изобретения, в зависимости от болезненного состояния и биологического контекста, допустимо применение агентов РНКи по настоящему изобретению для установки уровня экспрессии, действия Beta-ENaC и/или уровня, который ниже нормального уровня.

Известно, что различные факторы изменяют уровень ENaC или особенно Beta-ENaC. К гормонам, которые повышают физиологическое действие ENaC, относятся альдостерон, вазопрессин и инсулин. Регуляция Beta-ENaC повышается специфически под действием вазопрессина и за счет ограничения воды, а также при нагрузке натрием бикарбонатом у крыс. Такие различные факторы могут применяться в качестве контролей при определении воздействия агента РНКи на уровень Beta-ENaC.

Типы агентов РНКи и их модификации.

Применение агентов РНКи или композиций, включающих антисмысловую нуклеиновую кислоту, для снижения модуляции экспрессии определенного белка в клетке известно в данной области. Агент РНКи включает последовательность, комплементарную к кодирующей цепи другой нуклеиновой кислоты (например, иРНК) и способную к связыванию с ней за счет водородных связей. Таким образом, в различных вариантах осуществления настоящего изобретения к агентам РНКи по настоящему изобретению относятся какие-либо агенты РНКи, которые нацеливаются (например, комплементарны, способны к связыванию с ней за счет водородных связей и др.) на какую-либо последовательность, представленную, например, в табл. 1.

Антисмысловые последовательности, комплементарные иРНК, могут быть комплементарными по отношению к кодирующей области, 5'- или 3'-нетранслируемой области иРНК и/или области, связывающей кодирующие и нетранслируемые области и/или их части. Кроме того, агент РНКи или его часть могут быть комплементарны регуляторной области гена, кодирующего иРНК, например последовательности инициации транскрипции или трансляции или регуляторному элементу. В частности, агент РНКи или его часть могут быть комплементарны области, предшествующей или охватывающей кодон инициации кодирующей цепи, или 3'-нетранслируемой области иРНК.

Молекулы агента РНКи могут быть сконструированы по правилам спаривания оснований Уотсона и Крика. Агент РНКи может быть комплементарным по отношению к кодирующей области иРНК Beta-ENaC, но более предпочтительно он является олигонуклеотидом, антисмысловым только к части кодирующей или некодирующей области иРНК Beta-ENaC. Например, антисмысловый олигонуклеотид может быть комплементарным по отношению к области, близко расположенной к сайту инициации трансляции иРНК Beta-ENaC. В длину антисмысловой олигонуклеотид может составлять, например, примерно 5, 10, 15, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 нуклеотидов.

Агент РНКи может содержать модификации внутри или с одного или с обоих из концов. Модификации по концам могут помочь стабилизировать агент РНКи, защищая его от разрушения нуклеазами в крови. Агенты РНКи могут необязательно быть направленными на области иРНК Beta-ENaC, о которых известно, что они расположены около сайтов сплайсинга или по местам сплайсинга этого гена, или которые предположительно так расположены; например, соединения экзона-интрона (согласно описанному, например, Saxena и др., 1998).

Агенты РНКи также необязательно могут быть сконструированы для отжига с известными или прогнозируемыми доступными и/или одноцепочечными областями иРНК (например, петлями).

Агент РНКи может быть создан, используя химический синтез и реакции энзиматического лигирования, известные в данной области. Например, агент РНКи может быть синтезирован химически, используя природные нуклеотиды или различные модифицированные нуклеотиды, сконструированные для снижения эффектов вне мишени, и/или повышения биологической стабильности молекул, или повышения физической стабильности дуплекса, сформированного между антисмысловой и смысловой нуклеиновыми кислотами, например, могут применяться фосфоротиоатные производные и акридин-замещенные нуклеотиды.

Обозначения "G", "C", "A", "T" и "U" обычно применяют для нуклеотидов, содержащих азотистые основания гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил соответственно. Однако понятия "рибонуклеотид" или "нуклеотид" также могут относиться к модифицированному нуклеотиду или замещающей части молекулы. Специалистам в данной области известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть замещены другими частями молекулы без существенного изменения свойств по спариванию оснований олигонуклеотидов, включая такую замещаемую часть молекулы с нуклеотидом. Например, нуклеотид, включающий инозин в качестве основания, может основывать пару с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил, но ими перечень не ограничивается. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть замещены в последовательностях нуклеотидов дцРНК, описанных в настоящем изобретении, на нуклеотид, содержащий, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в каком-либо месте олигонуклеотид может быть замещен гуанином и урацилом, соответственно, для формирования неоднозначных пар оснований G-U, спаривающихся с иРНК-мишенью. Последовательности, содержащие такие замещающие части молекул, применимы для композиций и способов, свойственных для настоящего изобретения.

Специалистам в данной области известно, что понятие "молекула РНК" или "молекула рибонуклеиновой кислоты" относится не только к молекулам РНК, экспрессированным или обнаруженным в природе (т.е. природным), но также к неприродным аналогам и производным РНК, включающим один или несколько аналогов или производных рибонуклеотида/рибонуклеозида, описанных в настоящем изобретении или известных в настоящей области. Если формулировать кратко, понятие "рибонуклеозид" включает пару нуклеозидов и сахар рибозу, а понятие "рибонуклеотид" означает рибонуклеозид с одним, двумя или тремя фосфатами. Однако понятия "рибонуклеозид" и "рибонуклеотид" могут рассматриваться в настоящем изобретении в качестве эквивалентов. Модификации РНК могут затрагивать структуру оснований или структуру каркаса рибозы-фосфата, например, согласно описанному ниже. Однако молекулы, включающие аналоги или производные рибонуклеозидов, должны сохранять способность формировать дуплекс. В качестве примеров, которыми перечень, однако, не ограничивается, также может быть по меньшей мере один модифицированный рибонуклеозид, включая, но ими не ограничиваясь, 2'-О-метилмодифицированный нуклеотид, нуклеозид, включающий 5'-фосфоротиоатную группу, концевой нуклеозид, связанный с холестерильным производным или бисдециламидной группы додекановой кислоты, замкнутый нуклеотид, абазический нуклеозид, 2'-дезоксид-2'-фтор-модифицированный нуклеозид, 2'-амино-модифицированный нуклеозид, 2'-алкил-модифицированный нуклеозид, морфолиновый нуклеозид, незамкнутый рибонуклеотид (например, ациклический нуклеотидный мономер, описанный в WO 2008/147824), фосфорамидат или неприродное основание, включающее нуклеозид, или какая-либо их комбинация. В другом варианте молекула РНК может включать по меньшей мере два модифицированных рибонуклеозида, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или более, вплоть до полной длины молекулы дцРНК. Модификации необязательно могут быть одинаковыми для каждого из множества модифицированных рибонуклеозидов в молекуле РНК. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированными РНК, предусмотренными для применения в способах и композициях, описанных в настоящем изобретении, являются пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК), которые могут формировать необходимую структуру дуплекса

и которые допускают или опосредуют специфическое разрушение РНК-мишени по метаболическому пути RISC.

К примерам модифицированных нуклеотидов, которые могут применяться для получения агента РНКи, относятся 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксихидроксиметил)урацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоурин, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, бета-D-галактозилквеозин, инозин, N6-изопентиладенин, 1-метилгуанин, 1-метилюридин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеозин, 5'-метоксикарбоксиметиламинометилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N6-изопентиладенин, урацил-5-оксиуксусная кислота (v), вибутоксозин, псевдоурацил, квеозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, урацил-5-оксиуксусная кислота (v), 5-метил-2-тиоурацил, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксыпропил) урацил, (аср3)w и 2,6-диаминопуридин.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к какому-либо модифицированному варианту какого-либо агента РНКи, описанного в настоящем изобретении. Модифицированный вариант содержит ту же последовательность, но может быть модифицирован для включения модификаций в фосфате, сахаре, основании, нуклеотиде и т.д. Например, модифицированный вариант может включать один или несколько модифицированных нуклеотидов, перечисленных в настоящем изобретении, например С, замещенный 2'-модифицированным С.

В одном из объектов настоящего изобретения к модифицированному рибонуклеозиду относится дезоксирибонуклеозид. В этом случае агент РНКи может включать один или несколько дезоксинуклеозидов, включая, например, дезоксинуклеозидный выступ (выступы) или один или несколько дезоксинуклеозидов в двухцепочечной части дцРНК. Однако очевидно, что ни при каких обстоятельствах молекула двухцепочечной ДНК не будет относиться к "агенту РНКи".

Замещение 3'-концевых нуклеотидных выступающих сегментов 21-мерного дуплекса миРНК, обладающего 3'-выступами из двух нуклеотидов, на дезоксирибонуклеотиды не оказывает побочного воздействия на действие РНКи. Замещение до четырех нуклеотидов с каждого конца миРНК на дезоксирибонуклеотиды устойчиво, но полное замещение на дезоксирибонуклеотиды приводит к утрате активности РНКи. См. WO 00/44914 и WO 01/68836, в которых ранее сообщалось, что миРНК могут включать модификации либо в каркасе молекулы из фосфата-сахара, либо в нуклеозиде для включения в качестве гетероатома по меньшей мере одного азота или серы. В канадской патентной заявке 2359180 также описывают определенные химические модификации для применения в конструкциях дцРНК для предотвращения активированию двухцепочечной РНК-зависимой протеинкиназы PKR, особенно 2'-амино- или 2'-О-метил-нуклеотиды и нуклеотиды, содержащие 2'-О или 4'-С метиленовый мост. Дополнительные 3'-концевые нуклеотидные выступы включают dT (дезокситимидин), 2'-О,4'-С-этилентимидин (eT) и 2-гидроксиэтилфосфат (hp).

Parrish и др., Molecular Cell 6, 2000, p. 1077-1087 исследуют определенные химические модификации, нацеливающиеся на ген unc-22 у *C. elegans*, используя длинные транскрипты миРНК (>25 нуклеотидов). Авторы описывают внедрение тиофосфатных остатков в такие транскрипты миРНК путем инкорпорирования тиофосфатных нуклеотидных аналогов РНК-полимеразой фагов T7 и T3 и наблюдают, что молекулы РНК с двумя фосфоротиоатными модифицированными основаниями также обладают существенным снижением эффективности в качестве агентов РНКи. Кроме того, Parrish и др. сообщают, что фосфоротиоатная модификация более двух остатков значительно дестабилизирует молекулы РНК *in vitro* таким образом, что интерферирующее действие не поддается анализу. (Parrish и др., Molecular Cell 6, 2000, p. 1081). Авторы также исследовали определенные модификации в 2'-положении сахара нуклеотида в длинных транскриптах миРНК и установили, что замещение дезоксинуклеотидов на рибонуклеотиды приводит к существенному снижению интерферирующего действия, особенно в случаях замещения уридина на тимидин и/или цитидин на дезоксицитидин. (Parrish и др., Molecular Cell 6, 2000, p. 1077-1087). Кроме того, авторы исследуют определенные модификации, включая замещения в смысловой и антисмысловых цепях миРНК, 4-тиоурацил, 5-бром урацил, 5-йодурацил и 3-(аминоаллил)урацил на урацил и инозин на гуанозин. Если замещения на 4-тиоурацил и 5-бром урацил устойчивы, Parrish и др. сообщают, что замещение инозином приводит к существенному снижению интерферирующего действия при включении в любую из цепей. Parrish и др. также сообщают, что включение 5-йодурацила и 3-(аминоаллил)урацила в антисмысловую цепь также приводит к существенному снижению действия РНКи.

Специалистам в данной области известно, что можно синтезировать и модифицировать миРНК, используя какой-либо обычный известный в данной области способ (см. Henschel и др., Nucleic Acids Research, 32 (Web Server Issue), 2004, p. W113-W120). Кроме того, специалистам в данной области известно, что существуют разнообразные регуляторные последовательности (например, конститутивные или индуцибельные промоторы, тканеспецифические промоторы или их функциональные фрагменты и др.), которые применимы для конструкции/вектора экспрессии антисмыслового олигонуклеотида, миРНК или кшРНК.

В данной области известно несколько примеров, описывающих модификации сахара, фосфата и каркаса молекул, которые могут быть интродуцированы в молекулы нуклеиновой кислоты с существенным повышением их стабильности к нуклеазам и эффективности. Например, олигонуклеотиды модифицированы для повышения стабильности и/или повышения биологического действия группами, устойчивыми к нуклеазам, например 2'-амино-, 2'-С-аллил-, 2'-фтор-, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-Н-модификациями нуклеотидных оснований (см. обзор Usman и Cedergren, *TIBS*, 17, 1992, p. 34; Usman и др., *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 31, 1994, p. 163; Burgin и др., *Biochemistry* 35, 1996, p. 14090). Модификации сахара молекул нуклеиновой кислоты подробно описаны в данной области.

Были описаны дополнительные модификации и конъюгации агентов РНКи. В работе Soutschek и др., *Nature*, 432, 2004, p. 173-178 описана конъюгация холестерина с 3'-концом смысловой цепи молекулы мРНК с помощью пирролидинового линкера, тем самым получая ковалентный и необратимый конъюгат. Химические модификации (включая конъюгацию с другими молекулами) агентов РНКи также могут быть произведены для улучшения *in vivo* фармакокинетического времени удержания и эффективности.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения агент РНКи к Beta-ENaC включает по меньшей мере один 5'-уридин-аденин-3' (5'-ua-3') динуклеотид, в котором уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом; по меньшей мере один 5'-уридин-гуанин-3' (5'-ug-3') динуклеотид, в котором 5'-уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом; по меньшей мере один 5'-цитидин-аденин-3' (5'-ca-3') динуклеотид, в котором 5'-цитидин является 2'-модифицированным нуклеотидом; и/или по меньшей мере один 5'-уридин-уридин-3' (5'-uu-3') динуклеотид, в котором 5'-уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения агент РНКи включает 2'-модификацию, выбранную из группы, включающей 2'-дезоксид, 2'-дезоксид-2'-фтор, 2'-О-метил, 2'-О-метоксиэтил (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропил (2'-О-АП), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил (2'-О-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-О-DMAEOE) и 2'-О-N-метилацетиамидо (2'-О-NMA).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения РНКи включает гэп или ошибочно спаренное основание. Например, может быть каркас молекулы из фосфата-сахара, но с недостающим основанием.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения агент РНКи содержит одноцепочечный ник (например, разрыв или ошибочную связь в каркасе молекулы). В различных вариантах осуществления настоящего изобретения однонитевой ник может быть или в смысловой, или в антисмысловой цепи, или в обеих.

Ник может быть, например, в смысловой цепи, создавая малую внутренне сегментированную интерферирующую РНК или мРНК, которая может иметь меньшие эффекты, удаленные от мишени, чем соответствующий агент РНКи без ника.

Антисмысловая нуклеиновая кислота или агент РНКи также может иметь иной каркас молекулы, например закрытые нуклеиновые кислоты (ЗНК), морфолины, пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК), треозо-нуклеиновые кислоты (ТНК) или гликолевая нуклеиновая кислота (glycol nucleic acid - GNA), и/или на нее может быть нанесена метка (например, радиометка или иная метка).

Одна или обе цепи могут включать другой каркас молекулы.

В еще одном другом варианте осуществления настоящего изобретения агент РНКи, используемый в способах настоящего изобретения, может включать α -аномерную молекулу нуклеиновой кислоты. Молекула α -аномерной нуклеиновой кислоты формирует специфические двухцепочечные гибриды с комплементарной РНК, в которой в противоположность обычным β -единицам цепи проходят параллельно друг другу. Gaultier и др., *Nucleic Acids. Res.* 15, 1987, p. 6625-6641.

Молекула антисмысловой нуклеиновой кислоты также может включать 2'-о-метилрибонуклеотид (Inoue и др., *Nucleic Acids Res.* 15, 1987, p. 6131-6148) или химерный аналог РНК-ДНК (Inoue и др., *FEBS Lett.* 215, 1987, p. 327-330).

В еще одном другом варианте осуществления настоящего изобретения агент РНКи является рибозимом. Рибозимы - это каталитические молекулы РНК с рибонуклеазным действием, которые могут расщеплять одноцепочечную нуклеиновую кислоту, например иРНК, к которой они имеют комплементарную область. Таким образом, рибозимы [например, молоточковые рибозимы (описанные Haselhoff и др., *Nature* 334, 1988, p. 585-591)] могут применяться для каталитического расщепления транскриптов иРНК Beta-ENaC, чтобы тем самым ингибировать трансляцию иРНК Beta-ENaC.

В другом варианте генная экспрессия может подавляться путем нацеливания нуклеотидных последовательностей, комплементарных регуляторной области Beta-ENaC (например, промотор и/или энхансер) для формирования тройных спиральных структур, которые предупреждают транскрипцию гена Beta-ENaC. См. в первую очередь Helene, *Anticancer Drug Des.* 6(6), 1991, p. 569-584; Helene и др., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660, 1992, p. 27-36; Maher, *Bioassays*, 14(12), 1992, p. 807-815.

Получение агентов РНКи.

Агент РНКи может быть получен биологически, используя вектор экспрессии, в котором субклонирована нуклеиновая кислота в антисмысловой ориентации (т.е. РНК, транскрибированная с инсертированной нуклеиновой кислоты, может быть в антисмысловой ориентации по отношению к нуклеиновой кислоте-мишени). Агент РНКи также может быть получен биологически, используя вектор экспрессии, в котором субклонирована нуклеиновая кислота в качестве конструкции кшРНК (т.е. РНК, транскрибированная с инсертированной нуклеиновой кислоты, может включать первую область в антисмысловой ориентации с нуклеиновой кислотой-мишенью, вторую область, которая включает петлю или шарнир, и третью область в смысловой ориентации к нуклеиновой кислоте-мишени, причем первая и третья области транскрипта предпочтительно гибридизирована сама с собой, тем самым формируя структуру ствол-петля).

Способы получения агентов РНКи известны в данной области и доступны для специалистов в данной области.

Наборы для синтеза РНКи коммерчески доступны, например, от фирм New England Biolabs и Ambion.

Доставка агентов РНКи.

Агенты РНКи по настоящему изобретению могут быть доставлены или интродуцированы (например, в клетку *in vitro* для анализа животного или человека) с помощью каких-либо средств, известных в данной области.

Агенты РНКи по настоящему изобретению обычно вводят субъекту или вырабатывают *in situ* таким образом, что они гибридизируются с клеточной иРНК и/или геномной ДНК, кодирующей Beta-ENaC, и подавляют экспрессию путем подавления транскрипции и/или трансляции. Примером введения агента РНКи является прямая инъекция в ткань. В другом варианте агенты РНКи могут быть модифицированы для направленности на определенные клетки и затем введены системно. Например, для системного введения антисмысловые молекулы могут быть модифицированы таким образом, что они специфически связываются с рецепторами или антигенами, экспрессируемыми на поверхности определенных клеток, например, связыванием молекул антисмысловых нуклеиновых кислот с пептидами или антителами, которые связываются с рецепторами или антигенами на поверхности клеток. Антисмысловые молекулы нуклеиновых кислот также могут быть доставлены в клетки, используя векторы, известные в этой области и описанные, например, в патентной заявке US 20070111230, сущность которой включена в настоящее изобретение. Для достижения значительных внутриклеточных концентраций антисмысловых молекул предпочтительны векторные конструкции, в которых антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты помещена под контроль сильного промотора *pol II* или *pol III*.

В контексте настоящего изобретения понятие "интродукция в клетки", когда оно относится к агенту РНКи, означает облегчение, или эффективное потребление, или абсорбцию в клетку, что известно специалистам в данной области. Абсорбция или потребление агента РНКи может происходить путем пассивной диффузии, или активного клеточного процесса, или с помощью вспомогательных агентов или устройств. Понимание этого термина не ограничивается клетками *in vitro*; агент РНКи также может быть "интродуцированным в клетку", причем клетка является частью живого организма. В этом случае внедрение в клетку может включать поступление в организм. Например, для доставки *in vivo* агент РНКи может быть инъецирован в участок ткани или введен системно. *In vivo* доставка может быть с помощью системы доставки бета-глюкана, например, описанной в патентах US 5032401 и 5607677, а также в патентной публикации US 2005/0281781. *In vitro* внедрение в клетку включает способы, известные в данной области, например электропорацию и липофекцию. Другие подходы описаны в настоящем изобретении или известны в данной области.

Доставка агента РНКи в ткань осложнена, поскольку материал должен достичь органа-мишени и также должен проникнуть в цитоплазму клеток-мишеней. РНК не может преодолеть клеточные мембраны, поэтому маловероятно, чтобы системная доставка чистого агента РНКи была успешной. РНК быстро разрушается под действием РНКазы в сыворотке. В связи с этим были разработаны другие способы доставки агента РНКи к клеткам-мишеням. К известным в данной области способам относятся, но ими не ограничиваются, следующие: доставка с вирусом (ретровирусом, аденовирусом, лентивирусом, бакуловирусом, AAV); с липосомами (липофектамино, катионным DOTAP, нейтральным DOPC) или наночастицами (катионным полимером, ПЭИ), доставка с бактериями (tkRNAi) и также химическая модификация (LNA) миРНК для улучшения стабильности. Xia и др., *Nat. Biotechnol.*, 20, 2002, и Devroe и др., *BMC Biotechnol.* 2(1), 2002, р. 15, описывают включение миРНК в вирусный вектор. Рассмотрены другие системы доставки агентов РНКи, и агенты РНКи по настоящему изобретению могут быть доставлены разными методами, уже выявленными и/или одобренными FDA или другими авторитетными органами. Агенты РНКи по настоящему изобретению могут быть переработаны для доставки в соответствующую фармацевтическую композицию.

Фармацевтические агенты РНКи.

В контексте настоящего изобретения понятие "фармацевтическая композиция" подразумевает фармацевтически эффективное количество одного или нескольких агентов РНКи Beta-ENaC, фармацевтиче-

ски приемлемый носитель и необязательно дополнительное лечение заболевания, которое действует синергически с агентом РНКи. В контексте настоящего изобретения понятие "фармацевтически эффективное количество", "терапевтически эффективное количество" или просто "эффективное количество" относится к такому количеству агента РНКи, которое эффективно для выработки предназначенного фармакологического, терапевтического или профилактического результата. Например, если данное клиническое лечение рассматривают в качестве эффективного, имеется снижение по меньшей мере на 10% измеримого параметра, ассоциированного с заболеванием или расстройством, терапевтически эффективным количеством лекарственного средства для лечения этого заболевания или расстройства является количество, необходимое для эффективного снижения по меньшей мере на 10% такого параметра. В терапевтически эффективном количестве агента РНКи, нацеливающегося на Beta-ENaC, может понизить уровни белка Beta-ENaC по меньшей мере на 10%. В других вариантах осуществления настоящего изобретения данное клиническое лечение рассматривают в качестве эффективного, если имеется снижение по меньшей мере на 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% измеряемого параметра, связанного с заболеванием или расстройством, и терапевтически эффективным количеством лекарственного средства для лечения такого заболевания или расстройства является количество, необходимое для снижения воздействия по меньшей мере на 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95%, соответственно указанного параметра.

В контексте настоящего изобретения понятие "фармацевтически приемлемый носитель" относится к носителю для введения терапевтического агента. К таким носителям относятся, но ими перечень не ограничивается, физиологический солевой раствор, буферный солевой раствор, декстроза, вода, глицерин, этанол и их комбинации. Это понятие специально исключает среду для культивирования клеток. Для лекарственных средств, вводимых перорально, к фармацевтически приемлемым носителям относятся, но ими не ограничиваются, фармацевтически приемлемые эксципиенты, например инертные растворители, разрыхляющие агенты, связывающие агенты, смазывающие агенты, подсластители, вкусовые агенты, красители и консерванты. К соответствующим инертным растворителям относятся натрий карбонат и кальций карбонат, натрий фосфат и кальций фосфат, лактоза, а кукурузный крахмал и альгиновая кислота являются соответствующими разрыхляющими агентами. К связывающим агентам могут относиться крахмал и желатин, а к смазывающим агентам, если они содержатся, обычно могут относиться магний стеарат, стеариновая кислота или тальк. При необходимости таблетки могут быть покрыты минералом, например, глицерил моностеаратом или глицерил дистеаратом, для отсрочки всасывания в желудочнокишечном тракте. Агенты, включенные в составы лекарственных средств, дополнительно описаны в настоящем изобретении ниже.

Фармацевтические композиции, включающие агент РНКи Beta-ENaC, могут быть в твердой форме, например порошки, гранулы, таблетки, пилюли, гелевые капсулы, желатиновые капсулы, липосомы, суппозитории, жевательные формы или пластыри. Фармацевтические композиции, включающие агент РНКи Beta-ENaC, также могут быть в жидкой форме, например растворы, эмульсии, суспензии, эликсиры или сиропы. Соответствующей жидкой основой может быть, например, вода, органические растворители, например многоатомные спирты, например глицерин или гликоли, включая пропиленгликоль и полиэтиленгликоль, или этанол, растворитель Cremophor EL или их смеси, в варьирующих пропорциях, в воде. Композиции могут включать аморфные или кристаллические гранулы наноразмера, покрытые альбумином или поверхностно-активным веществом.

Соответствующая основа может включать, например, антибактериальные и противогрибковые агенты, буферные агенты, кальций фосфат, целлюлозу, метилцеллюлозу, хлорбутанол, масло какао, красители, декстрин, эмульгаторы, энтеросолубильное покрытие, ароматизаторы, желатин, изотонические агенты, лецитин, магний стеарат, отдушки, многоатомные спирты, например маннит, инъекционные органические сложные эфиры, например этилолеат, парабен, фенолсорбиновую кислоту, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидин, фосфатно-солевой буфер (ФСБ), консерванты, пропиленгликоль, натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, натрий хлорид, сорбит, различные сахара (включая, но ими, не ограничиваясь, сахарозу, фруктозу, галактозу, лактозу и трегалозу), крахмал, воск для суппозиторий, тальк, растительные масла, например оливковое масло и кукурузное масло, витамины, воск и/или увлажняющие агенты. Для агентов РНКи к Beta-ENaC предпочтительная основа включает декстран и воду, например 5% глюкозу в воде (5% dextrose in water - D5W).

Биологически инертная часть фармацевтической композиции может необязательно подвергаться разрушению, позволяя с выдержкой во времени высвободить агент РНКи.

Фармацевтическая композиция может включать дополнительные компоненты, которые способствуют доставке, стабилизации, эффективности или снижению иммуногенности.

Фармацевтическая композиция, включающая агент РНКи к Beta-ENaC

Дополнительные компоненты фармацевтической композиции, включающей агент РНКи к Beta-ENaC, могут быть добавлены для того, чтобы способствовать доставке, стабилизации, эффективности или снижению иммуногенности.

Липосомы ранее использовали для доставки лекарств (например, для доставки химиотерапевтических средств). Липосомы (например, катионные липосомы) описаны в публикациях РСТ

WO 02/100435 A1, WO 03/015757 A1 и WO 04029213 A2; US 5962016; 5030453 и 6680068 и в патентной заявке US 2004/0208921. Способ получения липосом также описан в WO 04/002453 A1. Кроме того, нейтральные липиды были включены в катионные липосомы (например, Farhood и др., 1995).

Катионные липосомы применяли для высвобождения агента РНКи в различные типы клеток (Sioud и Sorensen, 2003; US 2004/0204377; Duxbury и др., 2004; Donze и Picard, 2002).

Применение нейтральных липосом описано в работе Miller и др., 1998 и в патентной заявке US 2003/0012812.

В контексте настоящего изобретения обозначение "SNALP" относится к стабильной частице нуклеиновой кислоты-липид (stable nucleic acid-lipid particle). SNALP представляет липидную частицу, покрывающую сниженное внутреннее пространство, включающее нуклеиновую кислоту, например РНКи или плазмиду, с которой транскрибируется РНКи. Частицы SNALP описывают, например, в патентных заявках US 20060240093, 20070135372 и WO 2009/082817.

Химическая трансфекция с применением методов на основе липидов, аминов и полимеров предусмотрена в продуктах фирм Ambion Inc., Austin, Техас и Novagen, EMD Biosciences, Inc, филиале фирмы Merck KGaA, Дармштадт, Германия); см. Ovcharenko D., Ambion TechNotes, 10(5), 2003, p. 15-16). Кроме того, Song и др. (Nat. Med. published online (Fete 10, 2003) doi: 10.1038/nm828) и другие [Caplen и др., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 98, 2001, p. 9742-9747; McCaffrey и др., Nature, 2001, 414, p. 34-39] описывают, что клетки печени могут эффективно трансфицироваться путем инъекции миРНК в кровеносное русло млекопитающих.

Различные молекулы применяли для доставки специфического в отношении клеток агента РНКи. Например, свойство протамина конденсировать нуклеиновые кислоты объединяли со специфическими антителами для доставки молекул миРНК. Song и др., Nat Biotech. 23, 2005, p. 709-717. Самоорганизующийся пэгилированный поликатионный полиэтиленимин (ПЭИ) также применяли для конденсирования и защиты молекул миРНК. Schiffelers и др., Nucl. Acids Res., 32, e149, 2004, p. 141-158.

Наночастицы, включающие миРНК, затем успешно доставляли к вновь сформированной кровеносной сети опухоли, сверхэкспрессирующей интегрин. Hu-Lieskovan и др., Cancer Res. 65, 2005, p. 8984-8992.

Агенты РНКи по настоящему изобретению могут быть доставлены, например, с помощью липидных наночастиц (ЛНЧ); нейтральных липосом (НЛ); полимерных наночастиц; мотивов, связывающих двухцепочечную РНК (дцРНКсм); или за счет модификации агента РНКи (например, ковалентное присоединение к дцРНК).

Липидные наночастицы (ЛНЧ) представляют самоорганизующиеся катионные системы на основе липидов. Они могут включать, например, нейтральный липид (основание липосомы); катионный липид (для загрузки миРНК); холестерин (для стабилизации липосом) и ПЭГ-липид (для стабилизации состава, экранирования заряда и продленного циркулирования в кровеносном русле).

К катионному липиду может относиться, например, головная группа, линкер, хвост и холестеринный хвост. ЛНЧ могут обладать, например, хорошим поступлением в опухоль, продленным циркулированием в крови, малым размером частиц (например, менее 100 нм) и стабильностью в микросреде опухоли (которая обладает низкой величиной рН и характеризует гипоксией).

Нейтральные липосомы (НЛ) являются частицами, основанными не на катионном липиде

Полимерные наночастицы являются самоорганизующимися частицами на основе полимера.

Мотивы связывающих двухцепочечных РНК (дцРНКсм) являются самоорганизующимися РНК-связывающими белками, требующими модификаций.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения агент РНКи к Beta-ENaC лигирован с одним или несколькими диагностическими соединениями, репортерной группой, агентом перекрестного связывания, определяющей резистентность к нуклеазе частью молекулы, природным или необычным нуклеиновым основанием, липофильной молекулой, холестерином, липидом, лектином, стероидом, увалом, гецигенином, диосгенином, терпеном, тритерпеном, сарсасопогенином, фрайделином, дериватизированной эпифрайделанолом литохолиевой кислотой, витамином, углеводом, декстраном, пуллуланом, хитином, хитозаном, синтетическим углеводом, 15-мерным олиголактатом, природным полимером, низкомолекулярным полимером или полимером средней молекулярной массы, инулином, циклодекстрином, гиалуроновой кислотой, белком, белок-связывающим агентом, интегрин-нацеливающей молекулой, поликатионным агентом, пептидом, полиамином, миметиком пептида и/или трансферинном.

Агенты РНКи по настоящему изобретению могут быть получены в составе фармацевтической композиции, включающей различные компоненты, предназначенные для определенного способа введения агента РНКи.

Введение агента РНКи

Фармацевтические композиции, включающие агент РНКи Beta-ENaC, могут вводиться заочно, ингаляционно (включая вдывание и глубокую ингаляцию), назально, перорально, парентерально, с помощью имплантата, инъекцией или инфузией эпидурально, внутриартериально, внутрисуставно, внутрикапсулярно, интракардиально, интрацеребровентрикулярно, интракраниально, внутрикочно, внутримышечно, внутриглазнично, внутривнутрино, интраспинально, интрастернально, интратекально, внутри-

венно, подпаутинно, подкапсулярно, подкожно, подкутикулярно, трансэндотелиально, транстрахеально, трансваскулярно, ректально, подъязычно, местно и/или вагинально. Введение может быть осуществлено с помощью инъекции, инфузии, кожного пластыря или какого-либо иного способа, известного в данной области. Состав может быть порошковым, распыляемым, аэрозольным, гранулированным или иным образом приготовленным для доставки. Введение жидкости может быть медленным или в виде болюсов, однако в некоторых обстоятельствах, известных в данной области, болюсные инъекции могут привести к потере материала через почки.

Фармацевтические композиции, включающие агент РНКи Beta-ENaC, могут вводиться с помощью медицинских устройств, известных в данной области. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агент РНКи может вводиться с помощью устройств без иглы для подкожной инъекции, например, описанных в US 5399163, 5383851, 5312335, 5064413, 4941880, 4790824 или 4596556. К примерам известных имплантов и модулей, применимых в настоящем описании, относятся патент US 4487603, который описывает имплантируемый микроинфузионный насос для распределения лекарственного средства с контролируемой скоростью; патент US 4486194, который описывает терапевтическое устройство для введения лекарственных средств через кожу; патент US 4447233, который описывает медицинский инфузионный насос для распределения лекарственного средства с точной скоростью инфузии; патент US 4447224, который описывает имплантируемый аппарат для инфузии с переменной скоростью тока для непрерывной доставки лекарственного средства; патент US 4439196, который описывает осмотическую систему доставки лекарственного средства, обладающую многокамерными компартментами; и патент US 4475196, который описывает осмотическую систему доставки лекарственного средства. Специалистам в данной области известны многие другие подобные имплантаты, системы доставки и модули.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтические композиции, включающие агент РНКи, могут быть переработаны для обеспечения должного распределения *in vivo*. Введение агента РНКи к Beta-ENaC может быть системным (агент распределяется по всему организму) или, частичным, направленным на ткани или органы, которые экспрессируют (или сверхэкспрессируют или проявляют гиперактивность) Beta-ENaC, например легкие, почки, толстую кишку и железы. Способы нацеливания на такие определенные ткани или органы описаны в настоящем изобретении и/или известны в данной области. Например, они могут быть переработаны в липосомы. Описание способов получения липосом см., например, в US 4522811, 5374548 и 5399331. Липосомы могут включать одну или несколько частей молекулы, которые избирательно транспортируются в определенные клетки или органы и таким образом повышают целевую доставку лекарственного средства (см., например, V.V. Ranade, *J. Clin. Pharmacol.* 29, 1989, p. 685).

К примерам нацеливающих частей молекул относятся фолат или биотин (см., например, US 5416016); маннозиды (Umezawa и др., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 153, 1988, p. 1038); антитела (P.G. Bloeman и др., *FEBS Lett.*, 357, 1995, p. 140; M. Owais и др., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39, 1995, p. 180); поверхностно-активный рецептор белка A (Briscoe и др., *Am. J. Physiol.*, 1233, 1995, p. 134), разные виды которого могут представлять составы по настоящему изобретению, а также компоненты молекул, обладающие признаками изобретения; p120 (Schreier и др., *J. Biol. Chem.* 269, 1994, p. 9090); см. также K. Keinanen; M.X. Laukkanen, *FEBS Lett.*, 346, 1994, p. 123; J.J. Killion; I.J. Fidler, *Immunomethods*, 4, 1994, p. 273.

В настоящем изобретении также предусмотрены фармацевтические композиции, включающие один или несколько агентов РНКи к Beta-ENaC, которые могут необязательно включать различные модификации и/или дополнительные компоненты, для применения в лечении заболеваний, связанных с бета-субъединицей эпителиальных натриевых каналов (бета-ENaC).

Заболевания, связанные с бета-субъединицей эпителиальных натриевых каналов (бета-ENaC).

Настоящее изобретение охватывает агенты РНКи к бета-ENaC и введение агентов РНКи людям и животным для лечения различных заболеваний, связанных с бета-субъединицей эпителиальных натриевых каналов (бета-ENaC).

Понятие "заболевание, связанное с бета-субъединицей эпителиальных натриевых каналов (бета-ENaC)" означает какое-либо заболевание, связанное с дисфункцией уровня, экспрессии и/или действия бета-ENaC, и/или какое-либо заболевание, которое может быть вылечено и/или облегчено путем модификации уровня, экспрессии и/или действия бета-ENaC. В частности, к таким заболеваниям относятся муковисцидоз, псевдогипоальдостеронизм типа 1 (ПГА1), синдром Лиддла, гипертензия, алкалоз, гипокалиемия и гипертензия, связанная с ожирением.

Понятие "муковисцидоз (МВ)" означает распространенное наследственное заболевание, связанное с мутациями в гене регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator - CFTR*). Ген CFTR кодирует сАМР-зависимый С1-канал и регулирует ENaC. При МВ в эпителии дыхательных путей нарушена CFTR-опосредованная секреция С1- и повышена ENaC-опосредованная абсорбция Na⁺. Такие нарушения ионного транспорта в дыхательных путях при муковисцидозе вызывают истощение объема влаги на поверхности дыхательных путей, нарушение очищения слизи и адгезии на слизистой, тем самым подтверждая, что истощение объема влаги на

поверхности дыхательных путей является ключевым механизмом при патогенезе болезни легких при муковисцидозе. У экспериментальных мышей специфичная для дыхательных путей сверхэкспрессия показывает, что один только повышенный транспорт Na^+ достаточен для индукции истощения объема влаги на поверхности дыхательных путей и МВ-подобное заболевание легких, включающее слизистую закупорку дыхательных путей, метаплазию бокаловидных клеток, хроническое нейтрофильное воспаление дыхательных путей, ослабленный клиренс бактериальных патогенов и в итоге смерть. См. Zhou и др. 2008, а также приведенные в этой работе ссылки.

Понятие "синдром Лиддла" означает аутосомную доминантную наследственную форму гипертонии, отличающуюся ранней и тяжелой гипертонией, часто сопровождаемой метаболическим алкалозом и гипокалиемией, причем все эти признаки характерны для избытка альдостерона (синдром Конна).

Однако уровни альдостерона в плазме низкие. Таким образом, синдром Лиддла также называют псевдоальдостеронизмом. Эта тяжелая форма гипертонии отвечает на лечение низкосолевой диетой и ингибиторами каналов Na^+ (K^+ -сберегающими диуретиками), подтверждая первичную нарушенную регуляцию ENaC. Заболевание связано с мутациями в Gamma-ENaC, а также с некоторыми мутациями в Beta-ENaC (P615S, P616L и Y618H в мотиве "PY", который имеет консенсусную последовательность PPXY; а также R564st, W574st, 579del32, Q589st, T592fr, A593fr и R595fr, где обозначение "fr" означает сдвиг рамки (frameshift), обозначение "del" означает делецию (deletion) и обозначение "st" означает ранний стоп-кодон).

Эти мутации вызывают сверхэкспрессию Na^+ -каналов, которые гиперактивны по сравнению с ENaC дикого типа. Эти мутации также предупреждают снижение регуляции канала, которая в норме присутствует при повышении внутриклеточного Na^+ ; каналы ENaC с мутацией Лиддла сохраняются в состоянии высокой активности, несмотря на высокую внутриклеточную концентрацию Na^+ . Таким образом, уровень и/или действие мутантного ENaC при синдроме Лиддла может модифицироваться под действием мРНК к Beta-ENaC или под действием такой мРНК в комбинации с известными способами лечения синдрома Лиддла, например в комбинации с низкосолевой диетой и ингибиторами Na^+ -каналов (K^+ -сберегающими диуретиками).

Дополнительную информацию по заболеваниям, связанным с бета-ENaC, см., например, в публикации Hummler и др., Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 276, 1999, p. 567-571.

Понятие "гипертония, ассоциированная с ожирением" означает гипертонию, связанную или ассоциированную с ожирением и др. Ожирение ассоциировано с гипертонией. Многочисленные механизмы были предложены для объяснения такой корреляции, включая (при ожирении) повышенное симпатическое действие; повышенное действие ренин-ангиотензин-альдостероновой системы; повышенный минутный сердечный выброс и повышенное механическое давление интерстициального жира на расположенные вокруг органы, гиперинсулинемию и/или инсулинорезистентность. Задержка натрия почками может произойти в результате одного из этих механизмов. В прямом почечном канальце и в собирающей протоке происходит реабсорбция натрия через ENaC. Уровни Beta-ENaC повышены в почках у крыс линии Zucker (модель ожирения у животных).

Vickel и др., Am. J. Physiol. Renal Physiol. 281, 2001, p. 639-648. Относительное повышение при избытке этого или других переносчиков натрия, без снижения других переносчиков натрия, вероятно, приводит к повышенной тубулярной реабсорбции натрия. В результате такие изменения при избытке почечного транспортера натрия могут играть роль в развитии и/или поддержании повышенного кровяного давления у млекопитающих с ожирением, в том числе у людей.

Понятие "псевдогипоальдостеронизм типа 1 (ПГА-1)" означает гетерологический клинический синдром, отличающийся устойчивостью минералокортикоидных рецепторов, т.е. потерю с мочой Na^+ и пониженную экскрецию K^+ , несмотря на повышенный уровень альдостерона. Тяжелая форма этого синдрома наследуется в качестве аутосомного рецессивного признака, проявляющегося в виде нескольких летальных эпизодов гипонатриемии, гипотонии и гипокалиемии, и проявляет изменение транспорта Na^+ в некоторых органах, почках, слюнных железах, потовых железах и толстой кишке. В некоторых семьях, показывающих такую форму ПГА-1, обнаружена связь с мутациями в какой-либо одной из трех субъединиц ENaC (включая G37S в Beta-ENaC).

Менее тяжелая форма ПГА-1 с аутосомным доминантным типом наследования симптоматически наиболее проявляется в раннем детстве, и с возрастом состояние улучшается. См. Hummler и др., Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 276, 1999, p. 567-571.

Агенты РНКи могут применяться для лечения заболеваний, связанных с Beta-ENaC, в частности тех заболеваний, которые ассоциированы с измененной экспрессией, действием и/или уровнями Beta-ENaC.

Применение агентов РНКи для лечения заболеваний, связанных с бета-субъединицей эпителиальных натриевых каналов (Beta-ENaC).

Агенты РНКи к Beta-ENaC, описанные в настоящем изобретении, могут быть переработаны в фармацевтические композиции, которые могут вводиться людям или животным. Такие композиции могут включать один или несколько агентов РНКи и необязательно дополнительные средства лечения, применимые для лечения заболеваний, связанных с Beta-ENaC. Они могут быть введены в качестве составляющей раннего/превентивного лечения и могут вводиться в терапевтически эффективной дозе. Фарма-

цветическая композиция может включать фармацевтический носитель и может вводиться каким-либо способом, известным в данной области. Такие разные объекты настоящего изобретения дополнительно подробно описаны ниже.

Агенты РНКи к Beta-ENaC могут вводиться людям и животным для лечения заболеваний, связанных с бета-субъединицей эпителиальных натриевых каналов (Beta-ENaC).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения композиции, включающие агент РНКи к Beta-ENaC, могут вводиться животным, а не людям. Например, композиции могут вводиться курам, индюшкам, сельскохозяйственным животным (например, овцам, свиньям, лошадям, крупному рогатому скоту и др.), домашним животным (например, кошкам и собакам) и могут быть эффективны в лечении муковисцидоза, псевдогипоальдостеронизма типа 1, синдрома Лиддла, гипертонии, алкалоза, гипокалиемии и/или гипертонии, связанной с ожирением, и других родственных заболеваний. В каждом случае агент РНКи к Beta-ENaC может быть выбран для спаривания с последовательностью Beta-ENaC генома животного и, в частности, содержит по меньшей мере один ошибочный нуклеотид от всех других генов в таком геноме животного. Агенты РНКи по настоящему изобретению, таким образом, могут применяться для лечения заболеваний, связанных с бета-субъединицей эпителиальных натриевых каналов (Beta-ENaC) у людей и животных.

В контексте настоящего изобретения применительно к экспрессии Beta-ENaC понятия "лечить", "лечение" и другие относятся к освобождению от патологических процессов, опосредованных экспрессией Beta-ENaC, или к их облегчению. В контексте настоящего изобретения в той мере, в которой они относятся к какому-либо из других условий, описанных в настоящем изобретении ниже (отличных от патологических процессов, опосредованных экспрессией Beta-ENaC), понятия "лечение", "лечить" и др. относятся к помощи или к облегчению по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с таким состоянием, или для замедления или прекращения прогрессирования или опережающего прогрессирования такого состояния, например замедляя прогрессирование липидного расстройства, например атеросклероза.

Понятие "лечение" также означает профилактику, терапию, лечение или какое-либо другое изменение в состоянии пациента, свидетельствующее об улучшении или отсутствии разрушения физического состояния. Понятие "лечение" означает лечение заболевания, связанного с Beta-ENaC (например, муковисцидоза, псевдогипоальдостеронизма типа 1, синдрома Лиддла, гипертонии, алкалоза, гипокалиемии и гипертонии, связанной с ожирением), или какое-либо соответствующее лечение какого-либо другого болезненного состояния пациента. В контексте настоящего изобретения понятия "лечение" и "лечить" относятся и к профилактике, и к превентивному лечению, а также к целительству или модифицирующему лечению, включая лечение пациентов с риском инфекционного заболевания или предположительно имеющих заболевание, а также пациентов, которые уже больны или у которых диагностировано болезненное состояние. Понятия "лечение" и "лечить" также относятся к поддержанию и/или индукции здоровья у индивидуума без указанного заболевания, но у которого может быть чувствительность к развитию нездорового состояния, например к нарушению баланса азота или потере мышечной массы. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения понятие "лечение" не подразумевает предупреждение болезненного состояния. Таким образом, настоящее изобретение применимо для подавления экспрессии гена Beta-ENaC и/или лечения заболевания, связанного с Beta-ENaC, у индивидуума, пораженного заболеванием, связанным с Beta-ENaC, или у индивидуума, чувствительного к заболеванию, связанному с Beta-ENaC. Индивидуум, "пораженный" заболеванием, связанным с Beta-ENaC, демонстрирует выявляемые симптомы, характерные для данного заболевания, или иначе было показано клинически, что такой индивидуум был подвергнут воздействию патогенов или маркеров заболевания, связанного с Beta-ENaC, или несет их. В качестве примера, не ограничивающего настоящее изобретение, можно упомянуть, что индивидуум, пораженный заболеванием, которое связано с Beta-ENaC, может проявлять внешние симптомы или может не проявлять внешних симптомов, но, что может быть показано с помощью клинического теста, несет белковые маркеры, ассоциированные с заболеваниями, связанными с Beta-ENaC, или генетический материал, ассоциированный с патогеном в крови.

Раннее лечение некоторых заболеваний, связанных с Beta-ENaC, может быть более эффективным, если вводят скорее раньше, чем позже. Превентивное раннее введение амилорида (ингибитора ENaC) полезно для лечения муковисцидоза у модельных мышей, в отличие от более позднего лечения. Сходным образом раннее применение антимикробных агентов при муковисцидозе более эффективно, чем лечение после выявления инфекции. Zhou и др., 2008. Таким образом, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения агент РНКи к Beta-ENaC вводят рано, до проявления заболевания и/или в качестве превентивного агента, что предпочтительнее, чем введение после выявления заболевания.

Лечение заболеваний, связанных с бета-субъединицей эпителиальных натриевых каналов (бета-ENaC), может включать разные схемы лечения, включающие агент РНКи к Beta-ENaC, и необязательно включающие дополнительное лечение, которое может быть методом (или процедурой) или дополнительной композицией (например, агентом или дополнительным агентом РНКи).

Дозы и эффективные количества агентов РНКи.

Агенты РНКи по настоящему изобретению вводят в дозе, составляющей терапевтически эффективное количество для пациента, нуждающегося в указанных агентах.

Понятие "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" означает количество, которое лечит заболевание или медицинское состояние индивидуума или в основном обеспечивает пищевую, физиологическую или медицинскую пользу для индивидуума. В контексте настоящего изобретения фразы "терапевтически эффективное количество" и "профилактически эффективное количество" относятся к количеству, которое обеспечивает терапевтическую пользу от лечения, предупреждения или ведения патологического процесса, опосредованного экспрессией Beta-ENaC, или очевидного симптома патологического процесса, опосредованного экспрессией Beta-ENaC. Определенное количество, которое терапевтически эффективно, может быть легко определено рядовым специалистом и может варьировать в зависимости от факторов, известных в данной области, например, типа патологического процесса, опосредованного экспрессией Beta-ENaC, историей болезни и возрастом, стадией патологического процесса, опосредованного экспрессией Beta-ENaC, и введением других агентов, которые ингибируют патологические процессы, опосредованные экспрессией Beta-ENaC.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения возраст пациента может составлять по меньшей мере примерно 1, 3, 6 или 9 месяцев или 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 лет. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения возраст пациента составляет примерно не более 1, 3, 6 или 9 месяцев или 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90 или 100 лет. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения масса тела пациента составляет по меньшей мере примерно 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380 или 400 фунтов. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения масса тела пациента составляет примерно не более 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380 или 400 фунтов.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения дозировка [по измерению только действующего ингредиента (ингредиентов)] может составлять по меньшей мере примерно 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 250, 300, 250, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 нг, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 250, 300, 250, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 мкг, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 250, 300, 250, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 мг. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения дозировка может составлять не более примерно 10, 25, 50, 100, 200, 250, 300, 250, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 мг. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения дозировка может вводиться по меньшей мере более одного раза в сутки, ежедневно, чаще раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно и/или каждые 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или в различных их комбинациях.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения дозировка коррелирует с массой тела или площадью поверхности тела индивидуума. Фактический уровень дозирования может варьировать для получения количества действующего агента, эффективного для определенного пациента, композиции и способа введения без проявления токсичности для пациента. Выбранная доза может зависеть от разных фармакокинетических факторов, включая действие определенного применяемого агента РНКи, способа введения, скорости экскреции агента РНКи, длительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в комбинации с агентом РНКи, от возраста, пола, массы тела, состояния, общего состояния здоровья и первичной истории болезни пациента, а также от других факторов, известных в медицине. Врач или ветеринар, практикующий в этой области, может легко определить требуемое эффективное количество агента РНКи. Приемлемой дозой может быть такое количество, которое представляет наименьшую дозу, эффективную для получения терапевтического эффекта, или доза, достаточная для получения терапевтического эффекта без индукции побочных эффектов.

Помимо терапевтически эффективной дозы одного или нескольких агентов РНКи к Beta-ENaC, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут включать или могут применяться вместе с дополнительным лечением заболевания, которое действует синергически с агентом РНКи. Например, фармацевтическая композиция может включать дополнительный агонист к ENaC, например калий-сберегающие диуретики, амилорид и триамтерен. Дополнительное лечение может проводиться наряду с введением фармацевтической композиции, например включая, но ею не ограничиваясь, регуляцию потребления соли с едой. В случае применения для лечения муковисцидоза фармацевтическая композиция может применяться вместе с различными лекарственными средствами и известным в данной области лечением, включая, но ими не ограничиваясь, антибиотики, терапию ДНазой, альбутерол, N-ацетилцистеин, дыхательную терапию, перкуссионную терапию, занятия аэробикой и различные лекарственные средства и способы терапии для лечения недомоганий, ассоциированных с муковисцидозом (например, с диареей, остеопорозом, диабетом, кровотечением и др.).

Дополнительные варианты агентов РНКи к Beta-ENaC.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривает композицию, включающую один или несколько агентов РНКи к Beta-ENaC. В одном из вариантов осуществления настоя-

щее изобретение включает агент РНКи, содержащий смысловую цепь и антисмысловую цепь. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антисмысловая цепь состоит, в значительной степени состоит или включает последовательность антисмысловой цепи агента РНКи из числа перечисленных, например, в табл. 1. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антисмысловая цепь состоит, в значительной степени состоит или включает последовательность с 0, 1, 2 или 3 несоответствиями относительно антисмысловой цепи какого-либо агента РНКи из числа перечисленных, например, в табл. 1. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антисмысловая цепь состоит из последовательности антисмысловой цепи агента РНКи, из числа перечисленных, например, в табл. 1, и дополнительно включает 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения антисмысловая цепь состоит из последовательности с 0, 1, 2 или 3 несоответствиями относительно антисмысловой цепи агента РНКи, из числа перечисленных, например, в табл. 1, и дополнительно включает 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения композиция по заявленному изобретению не содержит какого-либо определенного индивидуального агента РНКи, перечисленного, например, в табл. 1. В другом варианте осуществления настоящего изобретения агент РНКи к Beta-ENaC не включает последовательности агента РНКи к Beta-ENaC, описанной в патенте или научной литературе, например в патентной заявке US 60/346069 (PCT/US02/41850), и в работе Hyde и др. в кн.: "The 23rd North American Cystic Fibrosis Conference", Миннеаполис, 2009, 14-17 октября; или которую можно приобрести в качестве продукта sc-42418 (также можно приобрести другие близкие продукты) фирмы Santa Cruz Biotechnology, Санта-Круз, Калифорния.

Специфические варианты агентов РНКи к Beta-ENaC.

Различные специфические варианты агента РНКи к Beta-ENaC описаны в настоящем изобретении. Примеры дуплексных последовательностей, предусмотренных в настоящем изобретении, представлены, например, в табл. 1. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения включают агенты РНКи, которые содержат последовательности, отличающиеся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами или парами оснований (например, с 0, 1, 2 или 3 ошибками) относительно агентов РНКи, перечисленных, например, в табл. 1.

Несоответствие в настоящем изобретении означает различие между последовательностью оснований или длиной последовательностей, если две последовательности максимально выравнены и сопоставлены. Несоответствие в настоящем изобретении означает положение, при котором основание в одной последовательности несовместимо с основанием в другой последовательности. Таким образом, несоответствием считают, например, если положение в одной последовательности имеет определенное основание (например, А) и соответствующее положение в другой последовательности содержит другое основание (например, G).

Несоответствием также считают, например, если положение в одной последовательности имеет основание (например, А) и соответствующее положение в другой последовательности не содержит основания (например, в этом положении имеется абазический нуклеотид, который включает каркас молекулы в виде фосфата-сахара, но не включает основание). Одноцепочечный ник в каждой последовательности (или в смысловой, или антисмысловой цепи) не рассматривается в качестве несоответствия. В качестве неограничительного примера, в котором нельзя определить несоответствие, можно привести положение, при котором если одна последовательность включает последовательность AG, но другая последовательность включает последовательность AG с одноцепочечным ником между А и G. Модификацию основания также не рассматривают в качестве несоответствия. Таким образом, если одна последовательность включает С, а другая последовательность включает модифицированный С (например, 2'-модификация) в одном и том же положении, ошибка может быть не учтена.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение включает агент РНКи, содержащий антисмысловую цепь, включающую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи: AD-20807 (последовательности SEQ ID NO: 5 и 6 или SEQ ID NO: 115 и 116).

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения миРНК также дополнительно включает смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от смысловой цепи AD-20807.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК включает AD-20807.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК имеет последовательность, состоящую из последовательности AD-20807.

В еще одном из вариантов осуществления настоящее изобретение включает агент РНКи, включающий антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи: AD-20826 (последовательности SEQ ID NO: 43 и 44 или последовательности SEQ ID NO: 153 и 154).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК также дополнительно включает смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от смысловой цепи AD-20826.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК включает AD-20826.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК имеет последовательность, состоящую из последовательности AD-20626.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение включает агент РНКи, содержащий антисмысловую цепь, включающую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи: AD-20832, который включает последовательности SEQ ID NO: 55 и 56 или последовательности SEQ ID NO: 165 и 166.

В еще одном из вариантов осуществления настоящего изобретения миРНК также дополнительно включает смысловую цепь, включающую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от смысловой цепи AD-20832.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК включает AD-20832.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК имеет последовательность, состоящую из последовательности AD-20832.

В еще одном из вариантов осуществления настоящее изобретение включает агент РНКи, включающий антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи: AD-20834, который включает последовательности SEQ ID NO: 59 и 60 или последовательности SEQ ID NO: 169 и 170.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК также дополнительно включает смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от смысловой цепи AD-20834.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК включает AD-20834.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК имеет последовательность, состоящую из последовательности AD-20834.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение включает агент РНКи, содержащий антисмысловую цепь, включающую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи: AD-20848, который включает последовательности SEQ ID NO: 87 и 88 или последовательности SEQ ID NO: 197 и 198.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК также дополнительно включает смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от смысловой цепи AD-20848.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК включает AD-20848.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК имеет последовательности, состоящую из последовательности AD-20848.

В еще одном из вариантов осуществления настоящего изобретения включает агент РНКи, включающий антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи: AD-20861, который включает последовательности SEQ ID NO: 97 и 98 или последовательности SEQ ID NO: 207 и 208.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК также дополнительно включает смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от смысловой цепи: AD-20861.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК включает AD-20861.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК имеет последовательность, состоящую из последовательности AD-20861.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение включает агент РНКи, который проявляет нокдаун по меньшей мере примерно на 80% (остаточная активность гена составляет не более примерно 20%) гена Beta-ENaC в концентрации *in vitro* 10 нМ в клетках H441.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусмотрен агент РНКи, включающий антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи: AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861 или AD-20834.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК также дополнительно включает смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от смысловой цепи: AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861 или AD-20834.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК включает AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861 или AD-20834.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК имеет последовательность, состоящую из последовательности AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861 или AD-20834.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение предусматривает агент РНКи, проявляющий по меньшей мере примерно 70% нокдаун (остаточная генная активность составляет примерно 30%) гена Beta-ENaC в концентрации *in vitro* 10 нМ в клетках H441.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления настоящее изобретение включает агент РНКи, содержащий антисмысловую цепь, в которой имеется по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи: AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825 или AD-20867.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК также дополнительно включает смысловую цепь, включающую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от смысловой цепи: AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825 или AD-20867.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК включает AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825 или AD-20867.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК имеет последовательность, состоящую из последовательности AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825 или AD-20867.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение включает агент РНКи, проявляющий нокдаун по меньшей мере примерно на 60% (остаточная активность гена не превышает примерно 40%) гена Beta-ENaC в концентрации *in vitro* 10 нМ в клетках H441.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления настоящее изобретение включает агент РНКи, содержащий антисмысловую цепь, включающую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи: AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825; AD-20867; AD-20813; AD-20823; AD-20805; AD-20831; AD-20862; AD-20808 или AD-20827.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК также дополнительно включает смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от смысловой цепи: AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825; AD-20867; AD-20813; AD-20823; AD-20805; AD-20831; AD-20862; AD-20808 или AD-20827.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК включает AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825; AD-20867; AD-20813; AD-20823; AD-20805; AD-20831; AD-20862; AD-20808 или AD-20827.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК имеет последовательность, состоящую из последовательности AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825; AD-20867; AD-20813; AD-20823; AD-20805; AD-20831; AD-20862; AD-20808 или AD-20827.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение включает агент РНКи, проявляющий по меньшей мере примерно 50% нокдаун (остаточная активность гена составляет примерно не более 50%) гена Beta-ENaC *in vitro* в концентрации 10 нМ в клетках H441.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусматривают агент РНКи, содержащий антисмысловую цепь, включающую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи: AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825; AD-20867; AD-20813; AD-20823; AD-20805; AD-20831; AD-20862; AD-20808; AD-20827; AD-20828; AD-20812; AD-20836 или AD-20822.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК также дополнительно включает смысловую цепь, включающую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от смысловой цепи: AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825; AD-20867; AD-20813; AD-20823; AD-20805; AD-20831; AD-20862; AD-20808; AD-20827; AD-20828; AD-20812; AD-20836 или AD-20822.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК включает AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825; AD-20867; AD-20813; AD-20823; AD-20805; AD-20831; AD-20862; AD-20808; AD-20827; AD-20828; AD-20812; AD-20836 или AD-20822.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения миРНК имеет последовательность, состоящую из последовательности AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834; AD-20806; AD-20851; AD-20865; AD-20811; AD-20819; AD-20839; AD-20835; AD-20825;

нуклеотидами от антисмысловой цепи какого-либо одного или нескольких из следующих дуплексов или их модифицированных или немодифицированных вариантов: AD-20832, AD-20848, AD-20807, AD-20826, AD-20837, AD-20861, AD-20834, AD-20805, AD-20806, AD-20808, AD-20809, AD-20810, AD-20811, AD-20812, AD-20813, AD-20814, AD-20815, AD-20816, AD-20817, AD-20818, AD-20819, AD-20820, AD-20821, AD-20822, AD-20823, AD-20824, AD-20825, AD-20827, AD-20828, AD-20829, AD-20830, AD-20831, AD-20833, AD-20835, AD-20836, AD-20838, AD-20839, AD-20840, AD-20841, AD-20842, AD-20843, AD-20844, AD-20845, AD-20846, AD-20847, AD-20849, AD-20850, AD-20851, AD-20852, AD-20862, AD-20863, AD-20864, AD-20865, AD-20866, AD-20867 или их модифицированных или немодифицированных вариантов.

Дополнительные специфические варианты осуществления настоящего изобретения.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают агент РНКи, включающий первую и вторую цепи, причем последовательность первой цепи включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от последовательности первой цепи, и последовательность второй цепи включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от последовательности второй цепи, какого-либо агента РНКи, описанного в настоящем изобретении.

Таким образом, в различных вариантах осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение предусматривает агент РНКи, включающий смысловую и антисмысловую цепи, причем последовательность первой цепи включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от последовательности первой цепи, и последовательность второй цепи включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от последовательности второй цепи, какого-либо одного или нескольких из следующих дуплексов или их модифицированных или немодифицированных вариантов: AD-20832, AD-20848, AD-20807, AD-20826, AD-20837, AD-20861, AD-20834, AD-20805, AD-20806, AD-20808, AD-20809, AD-20810, AD-20811, AD-20812, AD-20813, AD-20814, AD-20815, AD-20816, AD-20817, AD-20818, AD-20819, AD-20820, AD-20821, AD-20822, AD-20823, AD-20824, AD-20825, AD-20827, AD-20828, AD-20829, AD-20830, AD-20831, AD-20833, AD-20835, AD-20836, AD-20838, AD-20839, AD-20840, AD-20841, AD-20842, AD-20843, AD-20844, AD-20845, AD-20846, AD-20847, AD-20849, AD-20850, AD-20851, AD-20852, AD-20862, AD-20863, AD-20864, AD-20865, AD-20866, AD-20867 или их модифицированных или немодифицированных вариантов.

Дополнительные специфические варианты осуществления настоящего изобретения.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают агент РНКи, включающий смысловую и антисмысловую цепи, причем антисмысловая цепь включает или состоит из антисмысловой цепи какого-либо агента РНКи, описанного в настоящем изобретении.

Таким образом, последующее описание представлено в виде примеров разных вариантов осуществления настоящего изобретения.

В настоящем изобретении предусматривают агент РНКи, включающий смысловую и антисмысловую цепи, причем антисмысловая цепь включает или состоит из антисмысловой цепи: AD-20832, AD-20848, AD-20807, AD-20826, AD-20837, AD-20861, AD-20834, AD-20805, AD-20806, AD-20808, AD-20809, AD-20810, AD-20811, AD-20812, AD-20813, AD-20814, AD-20815, AD-20816, AD-20817, AD-20818, AD-20819, AD-20820, AD-20821, AD-20822, AD-20823, AD-20824, AD-20825, AD-20827, AD-20828, AD-20829, AD-20830, AD-20831, AD-20833, AD-20835, AD-20836, AD-20838, AD-20839, AD-20840, AD-20841, AD-20842, AD-20843, AD-20844, AD-20845, AD-20846, AD-20847, AD-20849, AD-20850, AD-20851, AD-20852, AD-20862, AD-20863, AD-20864, AD-20865, AD-20866, AD-20867 или их модифицированных или немодифицированных вариантов.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают агент РНКи, включающий смысловую и антисмысловую цепи, причем антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи какого-либо агента РНКи, описанного в настоящем изобретении, или его модифицированного или немодифицированного варианта, причем антисмысловая цепь необязательно дополнительно включает 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более нуклеотидов (или какой-либо их диапазон, например 0-1, 1-2, 1-3, 1-4 нуклеотида и т.д.).

Таким образом, в различных вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают агент РНКи, включающий смысловую или антисмысловую цепь, причем антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи: AD-20832, AD-20848, AD-20807, AD-20826, AD-20837, AD-20861, AD-20834, AD-20805, AD-20806, AD-20808, AD-20809, AD-20810, AD-20811, AD-20812, AD-20813, AD-20814, AD-20815, AD-20816, AD-20817, AD-20818, AD-20819, AD-20820, AD-20821, AD-20822, AD-20823, AD-20824, AD-20825, AD-20827, AD-20828, AD-20829, AD-20830, AD-20831, AD-20833, AD-20835, AD-20836, AD-20838, AD-20839, AD-20840, AD-20841, AD-20842, AD-20843, AD-20844, AD-20845, AD-20846, AD-20847, AD-20849, AD-20850, AD-20851, AD-20852, AD-20862, AD-20863, AD-20864, AD-20865, AD-20866, AD-20867 или их модифицированных или немодифицированных вари-

антов, причем антисмысловая цепь необязательно включает 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более нуклеотидов (или какой-либо их диапазон, например, из 0-1, 1-2, 1-3, 1-4 нуклеотидов и др.).

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предусматривают агент РНКи, включающий первую и вторую цепи, причем последовательность первой цепи включает или представляет последовательность первой цепи и последовательность второй цепи включает или представляет последовательность второй цепи какого-либо агента РНКи, описанного в настоящем изобретении, или модифицированные или немодифицированные его варианты.

Таким образом, в различных вариантах осуществления настоящего изобретения описан агент РНКи, включающий первую и вторую цепи, причем последовательность первой цепи включает или представляет последовательность первой цепи, и последовательность второй цепи включает или представляет последовательность второй цепи из: AD-20832; AD-20848; AD-20807; AD-20826; AD-20837; AD-20861; AD-20834, AD-20805, AD-20806, AD-20808, AD-20809, AD-20810, AD-20811, AD-20812, AD-20813, AD-20814, AD-20815, AD-20816, AD-20817, AD-20818, AD-20819, AD-20820, AD-20821, AD-20822, AD-20823, AD-20824, AD-20825, AD-20827, AD-20828, AD-20829, AD-20830, AD-20831, AD-20833, AD-20835, AD-20836, AD-20838, AD-20839, AD-20840, AD-20841, AD-20842, AD-20843, AD-20844, AD-20845, AD-20846, AD-20847, AD-20849, AD-20850, AD-20851, AD-20852, AD-20862, AD-20863, AD-20864, AD-20865, AD-20866, AD-20867.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предусмотрены один или несколько агентов РНКи, перечисленных в настоящем изобретении.

Перекрывающиеся группы агентов РНКи к Beta-ENaC.

В различных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к группам агентов РНКи к Beta-ENaC с пересекающимися последовательностями. Таким образом, настоящее изобретение охватывает группы агентов РНКи, в которых каждый агент РНКи в группе перекрывается с каждым другим агентом РНКи в той же группе по меньшей мере на 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или более нуклеотидов. В частности, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения выступ составляет по меньшей мере 12 нуклеотидов.

Некоторые из агентов РНКи, перечисленных в настоящем изобретении, перекрывают последовательности друг друга. Табл. 2 представляет объединение некоторых из этих групп пересекающихся агентов РНКи, причем каждый представитель группы перекрывает каждого представителя этой же группы по меньшей мере на 12 нуклеотидов. Представлены пересекающиеся части из 12 нуклеотидов смысловой и антисмысловой цепи.

Таким образом, например, согласно представленному в табл. 2, последовательности агентов РНКи AD-20807 и AD-20832 выступают, причем выступ смысловой цепи включает последовательность UGAAGAAGUACC (SEQ ID NO: 223); такие агенты РНКи также перекрываются в последовательности антисмысловой цепи, в которой перекрывание представляет последовательность GGUACUUCUUA (SEQ ID NO: 224). Агенты РНКи AD-20807, AD-20862 и AD-20832 все перекрываются в смысловой цепи, в которой перекрывание представляет последовательность GAAGAAGUACCU (SEQ ID NO: 225); такие агенты РНКи также перекрываются в антисмысловой цепи, причем перекрывание представляет последовательность AGGUACUUCUUC (SEQ ID NO: 226). Таким образом, эти и другие различные наборы пересекающихся агентов РНКи, представленных в табл. 2, разделяют общие технические свойства, например, перекрывание в смысловой и антисмысловой цепи.

Определенные наборы пересекающихся агентов РНКи к Beta-ENaC приведены в табл. 2.

Настоящее изобретение также предусматривает какую-либо группу или подгруппу агентов РНКи, разделяющих общие технические свойства, причем общим техническим свойством является перекрывание (например, по меньшей мере из 12 нуклеотидов) последовательности в смысловой или антисмысловой цепи.

Таким образом:

Настоящее изобретение описывает агент РНКи, включающий антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи, и/или смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от смысловой цепи, из какой-либо из групп: AD-20807 и AD-20832 (или какой-либо другой группы, представленной в табл. 2).

Настоящее изобретение охватывает агент РНКи, включающий первую и вторую цепи, причем первая цепь включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от первой цепи, и/или вторая цепь включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от второй цепи, из какой-либо из групп: AD-20807 и AD-20832 (или какой-либо другой группы, представленной в табл. 2).

Настоящее изобретение охватывает агент РНКи, включающий первую и вторую цепи, причем первая цепь включает или состоит из последовательности первой цепи и/или вторая цепь включает или состоит из последовательности какой-либо из групп: AD-20807 и AD-20832 (или какой-либо другой группы, представленной в табл. 2).

Настоящее описание охватывает агент РНКи, включающий первую цепь и вторую цепь (причем первая и вторая цепи могут необязательно связываться ковалентно, связываться через петлю или линкер, или могут соприкасаться), в котором первая и/или вторая цепь включают, в существенной степени состоят или состоят из последовательностей с 0, 1, 2 или 3 ошибочными нуклеотидами или п.о. какой-либо из групп из: AD-20807 и AD-20832 (или какой-либо другой группы, представленной в табл. 2), необязательно дополнительно включая 0-10 нуклеотидов или п.о.

Настоящее описание сходным образом включает различные варианты осуществления, охватывающие группы перекрывающихся агентов РНКи, представленных в табл. 2.

Дополнительные определения.

В контексте настоящего изобретения понятия "агент РНКи", "агенты РНКи", "агент (агенты) РНКи" и другие все относятся без ограничений к одному или нескольким агентам РНКи по настоящему описанию.

Определения конкретных примеров дуплексных агентов РНКи к Beta-ENaC, описанных в настоящем изобретении, иногда имеют суффикс "b" после номера. Он означает номер партии. Таким образом, суффикс "b1" означает "партия 1". Таким образом, дуплекс РНКи обозначают, например, "AD-20807-b1" происходит из партии 1 и имеет ту же последовательность, что и какой-либо агент РНКи, обозначаемый "AD-20807".

Если не указано иначе, технические и научные термины, применяемые в настоящем изобретении, имеют те же значения, которые обычно подразумеваются специалистами в области, к которой относится данное изобретение.

Если не указано иначе, все методы, стадии, способы и манипуляции, которые специально в настоящем изобретении подробно не описываются, могут быть осуществлены и были осуществлены соответствующим образом, известным специалистам в данной области. Ссылки приводятся, например, на стандартные руководства и на общее состояние в данной области, описанное в настоящем изобретении, а также на другие источники, упоминаемые в настоящем изобретении.

Формула настоящего изобретения не ограничивается примерами и приводится ниже.

Хотя определенные варианты осуществления настоящего изобретения и пункты формулы настоящего изобретения подробно описаны, примеры приводятся только в качестве иллюстрации и не предназначены для ограничения рамок охвата прилагаемой формулы изобретения или рамок охвата какого-либо соответствующего дальнейшего применения. В частности, в настоящем изобретении предусмотрено, что различные замещения, изменения и модификации могут быть получены согласно раскрытию сущности настоящего изобретения, не отклоняясь от духа и области охвата настоящего изобретения, которые отражает формула изобретения. Выбор исходного материала в виде нуклеиновой кислоты, интересующего клона или типа библиотеки представляет обычную задачу для специалиста в данной области на базе описанных в настоящем изобретении вариантов его осуществления. Другие объекты, преимущества и модификации рассматриваются в рамках формулы настоящего изобретения. Пересмотр области охвата изобретения в позднее поданных соответствующих патентных заявках может произойти из-за ограничений, налагаемых патентным правом разных стран, и их не следует интерпретировать в качестве отказа от сущности данной формулы изобретения.

Другие дополнительные формулировки и очевидные варианты описанных агентов РНКи к Beta-ENaC могут быть продуманы специалистами в данной области. Примеры агентов РНКи к Beta-ENaC, которыми перечень согласно настоящему изобретению не ограничивается, описаны в примерах ниже, которые не ограничивают рамок охвата настоящего изобретения, ограниченных формулой изобретения.

Примеры

Пример 1. Биоинформатика и последовательности агентов Beta-ENaC (миРНК).

Конструирование олигонуклеотида Beta-ENaC осуществляют для идентификации молекул миРНК, нацеливающихся на ген Beta-ENaC ["натриевый канал, потенциал-независимый канал 1 бета" человека (NCBI человека имеет обозначение "SCNN1B") и ортологические последовательности макаки крабоеда (*Macaca fascicularis*) и крысы (*Rattus norvegicus*)]. В процессе конструирования используют SCNNB1 транскрипты NM_000336.2 человека (NCBI GeneId 6338), NM_012648.1 крысы (NCBI GeneId 24767) и последовательность полной длины макаки крабоеда (описание приводится в настоящем изобретении).

Все дуплексы миРНК разработаны таким образом, чтобы иметь 100% идентичность по отношению ко всем трем транскриптам SCNNB1. Все последовательности из транскрипта NM_000336.

Немодифицированные и модифицированные последовательности перечислены в табл. 1. К немодифицированным последовательностям относятся и смысловая, и антисмысловая последовательности, которые перечислены под номерами SEQ ID NO: 111-220. Соответствующие положения первого остатка по сравнению с транскриптом Beta-ENaC человека в последовательности SEQ ID NO: 222 также предусмотрены.

Согласно описанному ниже в табл. 1 также приведены примеры модифицированных вариантов таких последовательностей (SEQ ID NO: 1-110). В колонках табл. 1 "S" означает смысловую цепь, "AS" означает антисмысловую цепь, "Положение" означает положение первого нуклеотида. Модифицированные нуклеотиды, отмеченные строчными буквами (например, "с" и "u"), согласно описанному ниже в

табл. 1А.

В последовательностях, представленных в табл. 1, модифицированные и немодифицированные последовательности могут необязательно включать последовательность "dTsdT" с 3'-конца. Таким образом, например, AD-20805 необязательно может иметь модифицированную последовательность сAGuGAcuAcAAcAcGAccdTsdT (SEQ ID NO: 429) в смысловой цепи и GGUCGUGUUGuAGUcACUGdTsdT (SEQ ID NO: 430) в антисмысловой цепи. Согласно указанному ниже в табл. 1А, dT означает 2'-дезокситимидин-5'-фосфат и sdT означает 2'-дезокситимидин-5'-фосфориоат.

Таблица 1

Последовательности Beta-ENaC

ID дуплекса		SEQ ID	Модифицированная последовательность	SEQ ID	Немодифицированная последовательность	Положение
AD-20805	S	1	cAGuGAcuAcAAcAcGAc C	111	CAGUGACUACAACACGAC C	1298
	AS	2	GGUCGUGUUGuAGUcACU G	112	GGUCGUGUUGUAGUCACU G	1298
AD-20806	S	3	AuGAcAGAGAAGGcAcuu C	113	AUGACAGAGAAGGCACUU C	1011
	AS	4	GAAGUGCCUUCUCUGUcA U	114	GAAGUGCCUUCUCUGUCA U	1011
AD-20807	S	5	GuGAAGAAGuAccuGcuG A	115	GUGAAGAAGUACCUGCUG A	183
	AS	6	UcAGcAGGuACUUCUUA C	116	UCAGCAGGUACUUCUUA C	183
AD-20808	S	7	GuGAcuAcAAcAcGAccu A	117	GUGACUACAACACGACCU A	1300
	AS	8	uAGGUCGUGUUGuAGUcA C	118	UAGGUCGUGUUGUAGUCA C	1300
AD-20809	S	9	GGuGGAGGcccAcAccAA C	119	GGUGGAGGCCACACCAA C	1919
	AS	10	GUUGGUGUGGGCCUCcAC C	120	GUUGGUGUGGGCCUCCAC C	1919
AD-20810	S	11	uGGuGGAGGcccAcAccA A	121	UGGUGGAGGCCACACCA A	1918
	AS	12	UUGGUGUGGGCCUCcACc A	122	UUGGUGUGGGCCUCCACC A	1918
AD-20811	S	13	uuccAAGAccAcAuGAuc C	123	UUCCAAGACCACAUGAUC C	1347
	AS	14	GGAUcAUGUGGUcUUGGA A	124	GGAUcAUGUGGUcUUGGA A	1347
AD-20812	S	15	AGcuGGGAGGucAGcGuc u	125	AGCUGGGAGGUCAGCGUC U	402
	AS	16	AGACGcUGACCUCCcAGC U	126	AGACGcUGACCUCCcAGC U	402
AD-20813	S	17	GGGAGAAAUAcuGcAAcA A	127	GGGAGAAAUACUGCAACA A	1408
	AS	18	UUGUUGcAGuAUUUCUCC C	128	UUGUUGcAGUAUUUCUCC C	1408
AD-20814	S	19	ccAGuuuGGcuucuuGGAu G	129	CCAGUUUGGUUUCUGGAU G	1748
	AS	20	cAUCcAGAAGCcAAACUG G	130	CAUCCAGAAGCCAAACUG G	1748
AD-20815	S	21	AGuGAcuAcAAcAcGAcc u	131	AGUGACUACAACACGACC U	1299
	AS	22	AGGUCGUGUUGuAGUcAC U	132	AGGUCGUGUUGUAGUCAC U	1299
AD-20816	S	23	AAuAucAcccuGAGcAGG A	133	AAUAUCACCCUGAGCAGG A	1626
	AS	24	UCCUGCUcAGGGUGAuAU U	134	UCCUGCUcAGGGUGAUAU U	1626
AD-20817	S	25	ccuGcAGGccAcAAcAu c	135	CCUGCAGGCCACCAACAU C	836
	AS	26	GAUGUUGGUGGCCUGcAG G	136	GAUGUUGGUGGCCUGCAG G	836
AD-20818	S	27	AucAcccuGAGcAGGAAG G	137	AUCACCCUGAGCAGGAAG G	1629
	AS	28	CCUUCcUGCUcAGGGUGA U	138	CCUUCcUGCUcAGGGUGA U	1629
AD-20819	S	29	GcuGGGAGGucAGcGucu c	139	GCUGGGAGGUCAGCGUCU C	403
	AS	30	GAGACGcUGACCUCCcAG C	140	GAGACGcUGACCUCCcAG C	403

AD-20820	S	31	GAGcuGGGAGGucAGcGu c	141	GAGCUGGGAGGUCAGCGU C	401
	AS	32	GACGCUGACCCUCCcAGCU C	142	GACGCUGACCCUCCCAGCU C	401
AD-20821	S	33	GuGGccAGuuuGGcuucu G	143	GUGGCCAGUUUGGCUUCU G	1744
	AS	34	cAGAAGCcAAACUGGCcA C	144	CAGAAGCCAAACUGGCCA C	1744
AD-20822	S	35	cAGuuuGGcuucuGGAuG G	145	CAGUUUGGCUUCUGGAUG G	1749
	AS	36	CcAUcCAGAAGCcAAACU G	146	CCAUCCAGAAGCCAAACU G	1749
AD-20823	S	37	GGccAGuuuGGcuucuGG A	147	GGCCAGUUUGGCUUCUGG A	1746
	AS	38	UcCAGAAGCcAAACUGGC C	148	UCCAGAAGCCAAACUGGC C	1746
AD-20824	S	39	cuGGGuGGccAGuuuGGc u	149	CUGGGUGGCCAGUUUGGC U	1740
	AS	40	AGCcAAACUGGCcACCcA G	150	AGCCAAACUGGCCACCCA G	1740
AD-20825	S	41	ucuAcAGuGAcuAcAAcA c	151	UCUACAGUGACUACAACA C	1294
	AS	42	GUGUUGuAGUcACUGuAG A	152	GUGUUGUAGUCACUGUAG A	1294
AD-20826	S	43	GcAuGAcAGAGAAGGcAc u	153	GCAUGACAGAGAAGGCAC U	1009
	AS	44	AGUGCCUUCUCUGUcAUG C	154	AGUGCCUUCUCUGUCAUG C	1009
AD-20827	S	45	AuAucAcccuGAGcAGGA A	155	AUAUCACCCUGAGCAGGA A	1627
	AS	46	UUCCUGCUcAGGGUGAuA U	156	UUCCUGCUCAGGGUGAUA U	1627
AD-20828	S	47	cuAcAGuGAcuAcAAcAc G	157	CUACAGUGACUACAACAC G	1295
	AS	48	CGUGUUGuAGUcACUGuA G	158	CGUGUUGUAGUCACUGUA G	1295
AD-20829	S	49	uAucAcccuGAGcAGGAA G	159	UAUCACCCUGAGCAGGAA G	1628
	AS	50	CUUCCUGCUcAGGGUGAu A	160	CUUCCUGCUcAGGGUGAU A	1628
AD-20830	S	51	uGcAGGccAccAAcAucu u	161	UGCAGGCCACCAACAUCU U	838
	AS	52	AAGAUGUUGGUGGCCUGc A	162	AAGAUGUUGGUGGCCUGC A	838
AD-20831	S	53	cAuGAcAGAGAAGGcAcu u	163	CAUGACAGAGAAGGCACU U	1010
	AS	54	AAGUGCCUUCUCUGUcAU G	164	AAGUGCCUUCUCUGUCAU G	1010
AD-20832	S	55	uGAAGAAGuAccuGcuGA A	165	UGAAGAAGUACCUGCUGA A	184
	AS	56	UUcAGcAGGGuACUUCUc A	166	UUCAGCAGGUACUUCUUC A	184
AD-20833	S	57	GcuGGuGGAGGcccAcAc c	167	GCUGGUGGAGGCCACAC C	1916
	AS	58	GGUGUGGGCCUCcACcAG C	168	GGUGUGGGCCUCCACCAG C	1916
AD-20834	S	59	uAcAGuGAcuAcAAcAcG A	169	UACAGUGACUACAACACG A	1296
	AS	60	UCGUGUUGuAGUcACUGu A	170	UCGUGUUGUAGUCACUGU A	1296

AD-20835	S	61	AcAGAGAAGGcAcuuccu u	171	ACAGAGAAGGCACUCCU U	1014
	AS	62	AAGGAAGUGCCUUCUCUG U	172	AAGGAAGUGCCUUCUCUG U	1014
AD-20836	S	63	AcAGuGAcuAcAAcAcGA c	173	ACAGUGACUACAACACGA C	1297
	AS	64	GUCGUGUUGuAGUcACUG U	174	GUCGUGUUGUAGUCACUG U	1297
AD-20837	S	65	uGAGcuGGGAGGucAGcG u	175	UGAGCUGGGAGGUCAGCG U	400
	AS	66	ACGCUGACCUCcAGCUC A	176	ACGCUGACCUCcAGCUC A	400
AD-20838	S	67	uGGccAGuuuGGcuucuG G	177	UGGCCAGUUUGGCUUCUG G	1745
	AS	68	CcAGAAGCcAAACUGGCc A	178	CCAGAAGCCAACUGGCc A	1745
AD-20839	S	69	uGucucAGGAGcGGGAcc A	179	UGUCUCAGGAGCGGGACC A	1600
	AS	70	UGGUCCCcGUCCUGAGAc A	180	UGGUCCCcGUCCUGAGAc A	1600
AD-20840	S	71	GuGGAGGcccAcAccAAc u	181	GUGGAGGCCcACACCAAC U	1920
	AS	72	AGUUGGUGUGGGCCUCcA C	182	AGUUGGUGUGGGCCUCcA C	1920
AD-20841	S	73	GGGuGGccAGuuuGGcuu c	183	GGGUGGCCAGUUUGGCUU C	1742
	AS	74	GAAGCcAAACUGGCcACC C	184	GAAGCCAACUGGCCACC C	1742
AD-20842	S	75	GGuGGccAGuuuGGcuuc u	185	GGUGGCCAGUUUGGCUUC U	1743
	AS	76	AGAAGCcAAACUGGCcAC C	186	AGAAGCCAACUGGCCAC C	1743
AD-20843	S	77	ucAcccuGAGcAGGAAGG G	187	UCACCCUGAGCAGGAAGG G	1630
	AS	78	CCCUUCCUGcUCAGGGUG A	188	CCCUUCCUGcUCAGGGUG A	1630
AD-20844	S	79	GccAGuuuGGcuucuGGA u	189	GCCAGUUUGGCUUCUGGA U	1747
	AS	80	AUCcAGAAGCcAAACUGG C	190	AUCCAGAAGCCAACUGG C	1747
AD-20845	S	81	AGcuGGuGGAGGcccAcA c	191	AGCUGGUGGAGGCCcACA C	1915
	AS	82	GUGUGGGCCUCcAcAGC U	192	GUGUGGGCCUCcACCAGC U	1915
AD-20846	S	83	AucuccAuGGcuGAcuGG c	193	AUCUCCAUGGCUGACUGG C	1545
	AS	84	GCCAGUcAGCcAUGGAGA U	194	GCCAGUCAGCCAUGGAGA U	1545
AD-20847	S	85	GGcAuGAcAGAGAAGGcA c	195	GGCAUGACAGAGAAGGCA C	1008
	AS	86	GUGCCUUCUCUGUcAUGC C	196	GUGCCUUCUCUGUcAUGC C	1008
AD-20848	S	87	GGAGAAuAcuGcAAcAA c	197	GGAGAAUACUGCAACAA C	1409
	AS	88	GUUGUUGcAGuAUUUCUC C	198	GUUGUUGCAGU AUUUCUC C	1409
AD-20849	S	89	uGGGuGGccAGuuuGGcu u	199	UGGGUGGCCAGUUUGGCU U	1741
	AS	90	AAGCcAAACUGGCcACCc A	200	AAGCCAACUGGCCACC A	1741

AD-20850	S	91	GAGcuGGuGGAGGcccAc A	201	GAGCUGGUGGAGGCCAC A	1914
	AS	92	UGUGGGCCUCcACcAGCU C	202	UGUGGGCCUCCACCAGCU C	1914
AD-20851	S	93	GAcAGAGAAGGcAcuucc u	203	GACAGAGAAGGCACUUC U	1013
	AS	94	AGGAAGUGCCUUCUCUGU C	204	AGGAAGUGCCUUCUCUGU C	1013
AD-20852	S	95	AGuuuGGcuuccuGGAuGG G	205	AGUUUGGCCUUCUGGAUGG G	1750
	AS	96	CCcAUCcAGAAGcAAAC U	206	CCCAUCCAGAAGCCAAAC U	1750
AD-20861	S	97	uGAcAGAGAAGGcAcuuc c	207	UGACAGAGAAGGCACUUC C	1012
	AS	98	GGAAGUGCCUUCUCUGUc A	208	GGAAGUGCCUUCUCUGUC A	1012
AD-20862	S	99	GAAGAAGuAccuGcuGAA G	209	GAAGAAGUACCGCUGAA G	185
	AS	100	CUUcAGcAGGuACUUCUU C	210	CUUCAGCAGGUACUUCUU C	185
AD-20863	S	101	ucuccAuGGcuGAcuGGc c	211	UCUCCAUGGCUGACUGGC C	1546
	AS	102	GGCcAGUcAGCcAUGGAG A	212	GGCCAGUCAGCCAUGGAG A	1546
AD-20864	S	103	cuGGuGGAGGcccAcAcc A	213	CUGGUGGAGGCCACACC A	1917
	AS	104	UGGUGUGGGCCUcACcA G	214	UGGUGUGGGCCUCCACCA G	1917
AD-20865	S	105	cAGAGAAGGcAcuuccuu c	215	CAGAGAAGGCACUUCUU C	1015
	AS	106	GAAGGAAGUGCCUUCUCU G	216	GAAGGAAGUGCCUUCUCU G	1015
AD-20866	S	107	cuGcAGGccAccAAcAuc u	217	CUGCAGGCCACCAACAUC U	837
	AS	108	AGAUGUUGGUGGCCUGcA G	218	AGAUGUUGGUGGCCUGCA G	837
AD-20867	S	109	GGGcAuGAcAGAGAAGGc A	219	GGGCAUGACAGAGAAGGC A	1007
	AS	110	UGCCUUCUCUGUcAUGCC C	220	UGCCUUCUCUGUCAUGCC C	1007

Модификации последовательностей агентов РНК SEQ ID NO: 111-220 хорошо известны специалистам в данной области. Примеры и неограничительные модификации, перечисленные в табл. 1, также будут понятны специалистам в данной области, например смысловая (sense - S) и антисмысловая (antisense - AS) последовательности SEQ ID NO: 1-110.

Некоторые модификации расположены в местах, которые согласно прогнозу могут быть чувствительны к эндонуклеазам. Некоторые модификации разработаны для элиминации иммунного ответа на миРНК, при этом сохраняется активность. В общем смысловая цепь модифицирована интенсивно, а антисмысловая цепь модифицирована легко. Некоторые модификации решают более одной задачи.

Последовательности в табл. 1 и в других последовательностях обозначаются с помощью следующих аббревиатур.

Таблица 1А

Аббревиатуры

Аббревиатуры	Нуклеотид (нуклеотиды)
A	аденозин-5'-фосфат
C	цитидин-5'-фосфат
G	гуанозин-5'-фосфат
dT	2'-дезокситимидин-5'-фосфат
U	уридин-5'-фосфат
c	2'-О-метилцитидин-5'-фосфат
u	2'-О-метилуридин-5'-фосфат
sdT	2'- дезокситимидин-5'-фосфотротиоат

Выбор последовательности миРНК.

В целом 55 смысловых и 55 антисмысловых SCNNB1 -производных миРНК олигоцепей человека (агенты РНК к Beta-ENaC) синтезируют согласно описанному в примере 2. Смысловые и антисмысловые олигоцепи отжигают в дуплексы.

Пример 1А. Перекрывающиеся группы агентов РНК к Beta-ENaC.

Настоящее изобретение также относится к группам агентов РНК к Beta-ENaC с перекрывающимися последовательностями. Таким образом, настоящее описание предусматривает группы агентов РНК, причем каждый агент РНК в группе перекрывается с каждым другим агентом РНК в той же группе по меньшей мере на 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или более нуклеотидов. В частности, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения перекрывание составляет по меньшей мере 12 нуклеотидов.

Некоторые агенты РНКи, перечисленные в настоящем изобретении, перекрывают друг друга по последовательности. В табл. 2 представлено объединение некоторых таких групп перекрывающихся агентов РНКи, причем каждый представитель группы с любым другим представителем той же группы по меньшей мере на 12 нуклеотидов. Представлены перекрывающиеся части из 12 нуклеотидов смысловой и антисмысловой цепей.

Таким образом, показано, например, в табл.2 перекрывание последовательностей агентов РНКи AD-20807 и AD-20832, причем перекрывание в смысловой цепи включает последовательность UGAAGAAGUACC (SEQ ID NO: 223); такие агенты РНКи также перекрываются в последовательности антисмысловой цепи, причем перекрывание включает последовательность GGUACUUCUUCA (SEQ ID NO: 224). Агенты РНКи AD-20807, AD-20862 и AD-20832 все перекрываются в смысловой цепи, причем перекрывание включает последовательность GAAGAAGUACCU (SEQ ID NO: 225); эти агенты РНКи также перекрываются в антисмысловой цепи, причем перекрывание включает последовательность AGGUACUUCUUC (SEQ ID NO: 226). Таким образом, эти и другие различные группы перекрывающихся агентов РНКи, представленные в табл. 2, разделяют общие технические характеристики, например перекрывание в смысловой и антисмысловой цепях.

Определенные группы перекрывающихся агентов РНКи к Beta-ENaC предусмотрены в табл. 2.

Настоящее изобретение, таким образом, охватывает какую-либо группу или подгруппу агентов РНКи, представляющую общую техническую характеристику, которой является перекрывание (например, по меньшей мере из 12 нуклеотидов) последовательности в смысловой или антисмысловой цепи.

Таблица 2

Положение	Перекрывание смысловой цепи	SEQ ID	Перекрывание антисмысловой цепи	SEQID	Перекрывание агентов РНКи к Beta-ENaC
183	UGAAGAAGUACC	223	GGUACUUCUUCA	224	AD-20807, AD-20832
184	GAAGAAGUACCU	225	AGGUACUUCUUC	226	AD-20807, AD-20862, AD-20832
185	AAGAAGUACCUG	227	CAGGUACUUCUU	228	AD-20807, AD-20862, AD-20832
186	AGAAGUACCUGC	229	GCAGGUACUUCU	230	AD-20807, AD-20862, AD-20832
187	GAAGUACCUGCU	231	AGCAGGUACUUC	232	AD-20807, AD-20862, AD-20832
188	AAGUACCUGCUG	233	CAGCAGGUACUU	234	AD-20807, AD-20862, AD-20832
189	AGUACCUGCUGA	235	UCAGCAGGUACU	236	AD-20807, AD-20862, AD-20832
190	GUACCUGCUGAA	237	UUCAGCAGGUAC	238	AD-20862, AD-20832
400	GAGCUGGGAGGU	239	ACCUCCCAGCUC	240	AD-20820, AD-20837
401	AGCUGGGAGGUC	241	GACCUCCCAGCU	242	AD-20820, AD-20812, AD-20837
402	GCUGGGAGGUCA	243	UGACCUCCCAGC	244	AD-20820, AD-20819, AD-20812, AD-20837
403	CUGGGAGGUCA	245	CUGACCUCCCAG	246	AD-20819, AD-20812, AD-20837
404	UGGGAGGUCA	247	GCUGACCUCCCA	248	AD-20820, AD-20819, AD-20837
405	GGGAGGUCA	249	CGCUGACCUCCC	250	AD-20820, AD-20819, AD-20812, AD-20837
406	GGAGGUCA	251	ACGCUACCUCC	252	AD-20819, AD-20837
407	GAGGUCA	253	GACGCUACCUCC	254	AD-20820, AD-20819, AD-20812
408	AGGUCA	255	AGACGCUACCU	256	AD-20819, AD-20812
836	CUGCAGGCCACC	257	GGUGGCCUGCAG	258	AD-20866, AD-20817
837	UGCAGGCCACCA	259	UGGUGGCCUGCA	260	AD-20866, AD-20830, AD-

034363

					20817
838	GCAGGCCACCAA	261	UUGGUGGCCUGC	262	AD-20866, AD-20830, AD-20817
839	CAGGCCACCAAC	263	GUUGGUGGCCUG	264	AD-20866, AD-20830, AD-20817
840	AGGCCACCAACA	265	UGUUGGUGGCCU	266	AD-20866, AD-20830, AD-20817
841	GGCCACCAACAU	267	AUGUUGGUGGCC	268	AD-20866, AD-20830, AD-20817
842	GCCACCAACAUC	269	GAUGUUGGUGGC	270	AD-20866, AD-20830, AD-20817
843	CCACCAACAUCU	271	AGAUGUUGGUGG	272	AD-20866, AD-20830
1007	GGCAUGACAGAG	273	CUCUGUCAUGCC	274	AD-20847, AD-20867
1008	GCAUGACAGAGA	275	UCUCUGUCAUGC	276	AD-20826, AD-20867
1009	CAUGACAGAGAA	277	UUCUCUGUCAUG	278	AD-20826, AD-20831, AD-20867
1010	AUGACAGAGAAG	279	CUUCUCUGUCAU	280	AD-20826, AD-20831, AD-20867, AD-20806
1011	UGACAGAGAAGG	281	CCUUCUCUGUCA	282	AD-20826, AD-20831, AD-20867, AD-20806, AD-20861
1012	GACAGAGAAGGC	283	GCCUUCUCUGUC	284	AD-20851, AD-20847, AD-20826, AD-20831, AD-20867, AD-20806, AD-20861
1013	ACAGAGAAGGCA	285	UGCCUUCUCUGU	286	AD-20851, AD-20835, AD-20847, AD-20826, AD-20831, AD-20867, AD-20806, AD-20861
1014	CAGAGAAGGCAC	287	GUGCCUUCUCUG	288	AD-20851, AD-20835, AD-20865, AD-20826, AD-20831, AD-20806, AD-20861
1015	AGAGAAGGCACU	289	AGUGCCUUCUCU	290	AD-20851, AD-20835, AD-20865, AD-20826, AD-20831, AD-20806, AD-20861
1016	GAGAAGGCACUU	291	AAGUGCCUUCUC	292	AD-20851, AD-20835, AD-20865, AD-20831, AD-20806, AD-20861
1017	AGAAGGCACUUC	293	GAAGUGCCUUCU	294	AD-20851, AD-20835, AD-20865, AD-20806, AD-20861
1018	GAAGGCACUUCC	295	GGAAGUGCCUUC	296	AD-20851, AD-20835, AD-20865, AD-20861
1019	AAGGCACUUCU	297	AGGAAGUGCCUU	298	AD-20851, AD-20835, AD-20865
1020	AGGCACUUCUU	299	AAGGAAGUGCCU	300	AD-20835, AD-20865
1294	CUACAGUGACUA	301	UAGUCACUGUAG	302	AD-20828, AD-20825
1295	UACAGUGACUAC	303	GUAGUCACUGUA	304	AD-20834, AD-20825
1296	ACAGUGACUACA	305	UGUAGUCACUGU	306	AD-20828, AD-20834, AD-20825, AD-20836
1297	CAGUGACUACAA	307	UUGUAGUCACUG	308	AD-20834, AD-20805, AD-20825
1298	AGUGACUACAAC	309	GUUGUAGUCACU	310	AD-20828, AD-20834, AD-20805, AD-20825, AD-

034363

					20836
1299	GUGACUACAACA	311	UGUUGUAGUCAC	312	AD-20834, AD-20805, AD-20808, AD-20825
1300	UGACUACAACAC	313	GUGUUGUAGUCA	314	AD-20828, AD-20834, AD-20805, AD-20808, AD-20825, AD-20815, AD-20836
1301	GACUACAACACG	315	CGUGUUGUAGUC	316	AD-20828, AD-20834, AD-20805, AD-20808, AD-20836
1302	ACUACAACACGA	317	UCGUGUUGUAGU	318	AD-20834, AD-20805, AD-20808
1303	CUACAACACGAC	319	GUCGUGUUGUAG	320	AD-20805, AD-20808, AD-20815, AD-20836
1304	UACAACACGACC	321	GGUCGUGUUGUA	322	AD-20805, AD-20808
1305	ACAACACGACCU	323	AGGUCGUGUUGU	324	AD-20808, AD-20815
1408	GGAGAAUACUG	325	CAGUAUUUCUCC	326	AD-20813, AD-20848
1409	GAGAAUACUGC	327	GCAGUAUUUCUC	328	AD-20813, AD-20848
1410	AGAAUACUGCA	329	UGCAGUAUUUCU	330	AD-20813, AD-20848
1411	GAAUACUGCAA	331	UUGCAGUAUUUC	332	AD-20813, AD-20848
1412	AAUACUGCAAC	333	GUUGCAGUAUUU	334	AD-20813, AD-20848
1413	AAUACUGCAACA	335	UGUUGCAGUAUU	336	AD-20813, AD-20848
1414	AUACUGCAACAA	337	UUGUUGCAGUAU	338	AD-20813, AD-20848
1545	UCUCCAUGGCUG	339	CAGCCAUGGAGA	340	AD-20846, AD-20863
1546	CUCCAUGGCUGA	341	UCAGCCAUGGAG	342	AD-20846, AD-20863
1547	UCCAUGGCUGAC	343	GUCAGCCAUGGA	344	AD-20846, AD-20863
1548	CCAUGGCUGACU	345	AGUCAGCCAUGG	346	AD-20846, AD-20863
1549	CAUGGCUGACUG	347	CAGUCAGCCAUG	348	AD-20846, AD-20863
1550	AUGGCUGACUGG	349	CCAGUCAGCCAU	350	AD-20846, AD-20863
1551	UGGCUGACUGGC	351	GCCAGUCAGCCA	352	AD-20846, AD-20863
1626	AUAUCACCCUGA	353	UCAGGGUGAUAU	354	AD-20816, AD-20827
1627	UAUCACCCUGAG	355	CUCAGGGUGAUA	356	AD-20816, AD-20827, AD-20829
1628	AUCACCCUGAGC	357	GCUCAGGGUGAU	358	AD-20816, AD-20827, AD-20829, AD-20818
1629	UCACCCUGAGCA	359	UGCUCAGGGUGA	360	AD-20816, AD-20827, AD-20829, AD-20843, AD-20818
1630	CACCCUGAGCAG	361	CUGCUCAGGGUG	362	AD-20816, AD-20827, AD-20829, AD-20843, AD-20818
1631	ACCCUGAGCAGG	363	CCUGCUCAGGGU	364	AD-20816, AD-20827, AD-20829, AD-20843, AD-20818
1632	CCCUGAGCAGGA	365	UCCUGCUCAGGG	366	AD-20816, AD-20827, AD-20829, AD-20843, AD-20818
1633	CCUGAGCAGGAA	367	UCCUGCUCAGG	368	AD-20827, AD-20829, AD-20843, AD-20818
1634	CUGAGCAGGAAG	369	CUCCUGCUCAG	370	AD-20829, AD-20843, AD-20818
1635	UGAGCAGGAAGG	371	CCUCCUGCUCUA	372	AD-20843, AD-20818
1740	UGGGUGGCCAGU	373	ACUGGCCACCCA	374	AD-20824, AD-20849
1741	GGGUGGCCAGUU	375	AACUGGCCACCC	376	AD-20824, AD-20841, AD-20849
1742	GGUGGCCAGUUU	377	AAACUGGCCACC	378	AD-20824, AD-20842, AD-

					20841, AD-20849
1743	GUGGCCAGUUUG	379	CAAACUGGCCAC	380	AD-20824, AD-20842, AD-20821, AD-20841, AD-20849
1744	UGGCCAGUUUGG	381	CCAAACUGGCCA	382	AD-20824, AD-20842, AD-20821, AD-20838, AD-20841, AD-20849
1745	GGCCAGUUUGGC	383	GCCAAACUGGCC	384	AD-20824, AD-20842, AD-20821, AD-20838, AD-20841, AD-20823, AD-20849
1746	GCCAGUUUGGCU	385	AGCCAAACUGGC	386	AD-20844, AD-20824, AD-20842, AD-20821, AD-20838, AD-20841, AD-20823, AD-20849
1747	CCAGUUUGGCUU	387	AAGCCAAACUGG	388	AD-20814, AD-20844, AD-20842, AD-20821, AD-20838, AD-20841, AD-20823, AD-20849
1748	CAGUUUGGCUUC	389	GAAGCCAAACUG	390	AD-20814, AD-20844, AD-20842, AD-20821, AD-20838, AD-20841, AD-20822, AD-20823
1749	AGUUUGGCUUCU	391	AGAAGCCAAACU	392	AD-20814, AD-20844, AD-20842, AD-20821, AD-20852, AD-20838, AD-20822, AD-20823
1750	GUUUGGCUUCUG	393	CAGAAGCCAAAC	394	AD-20814, AD-20844, AD-20821, AD-20852, AD-20838, AD-20822, AD-20823
1751	UUUGGCUUCUGG	395	CCAGAAGCCAAA	396	AD-20814, AD-20844, AD-20852, AD-20838, AD-20822, AD-20823
1752	UUGGCUUCUGGA	397	UCCAGAAGCCAA	398	AD-20814, AD-20844, AD-20852, AD-20822, AD-20823
1753	UGGCUUCUGGAU	399	AUCCAGAAGCCA	400	AD-20814, AD-20844, AD-20852, AD-20822
1754	GGCUUCUGGAUG	401	CAUCCAGAAGCC	402	AD-20814, AD-20852, AD-20822
1755	GCUUCUGGAUGG	403	CCAUCCAGAAGC	404	AD-20852, AD-20822
1914	AGCUGGUGGAGG	405	CCUCCACCAGCU	406	AD-20850, AD-20845
1915	GCUGGUGGAGGC	407	GCCUCCACCAGC	408	AD-20850, AD-20845, AD-20833
1916	CUGGUGGAGGCC	409	GGCCUCCACCAG	410	AD-20850, AD-20845, AD-20833, AD-20864
1917	UGGUGGAGGCC	411	GGGCCUCCACCA	412	AD-20810, AD-20850, AD-20845, AD-20833, AD-20864
1918	GGUGGAGGCCCA	413	UGGGCCUCCACC	414	AD-20809, AD-20810, AD-20850, AD-20845, AD-20833, AD-20864
1919	GUGGAGGCCCAC	415	GUGGGCCUCCAC	416	AD-20809, AD-20810, AD-20850, AD-20845, AD-20833, AD-20864, AD-20840
1920	UGGAGGCCCACA	417	UGUGGGCCUCCA	418	AD-20809, AD-20810, AD-20850, AD-20845, AD-20833, AD-20864, AD-20840
1921	GGAGGCCACAC	419	GUGUGGGCCUCC	420	AD-20809, AD-20810, AD-20845, AD-20833, AD-20864, AD-20840
1922	GAGGCCACACC	421	GGUGUGGGCCUC	422	AD-20809, AD-20810, AD-20833, AD-20864, AD-20840
1923	AGGCCACACCA	423	UGGUGUGGGCCU	424	AD-20809, AD-20810, AD-20864, AD-20840
1924	GGCCACACCAA	425	UUGGUGUGGGCC	426	AD-20809, AD-20810, AD-20840
1925	GCCACACCAAC	427	GUUGUGUGGGC	428	AD-20809, AD-20840

Положение означает локализацию в NM_000336.2. Показаны примеры 12 перекрывающихся нуклеотидов в смысловой и антисмысловой цепях; во многих случаях в действительности перекрывание длиннее.

Пример 2. Синтез последовательностей агента РНК к Beta-ENaC.

Модифицированные последовательности агентов РНК к Beta-ENaC, перечисленные в виде последовательностей SEQ ID NO: 1-110 в табл. 1, синтезированы на синтезаторе MerMade 192 в количестве 1 мкМ.

Для всех последовательностей в перечне применяют "внутреннюю легкую" химию, подробно описанную ниже.

Все пиримидины (цитозин и уридин) в смысловой цепи содержат 2-О-метильные основания (2'-О-метил-С и 2'-О-метил-У).

В антисмысловой цепи пиримидины, присоединенные (по направлению к 5'-положению) к рибо А нуклеозиду, замещены на соответствующие 2-О-метил нуклеозиды.

Внедрено удлинение из двух нуклеотидов dTsdT с 3'-конца и смысловой, и антисмысловой цепей.

Файл последовательности преобразуют в текстовый файл для получения совместимости для загрузки в программу синтезатора MerMade 192.

Синтез, расщепление и снятие защиты.

Для синтеза последовательностей Beta-ENaC используют твердофазный синтез олигонуклеотидов, применяя химию фосфорамидита.

Синтез указанных выше последовательностей проводят в пределе 1 мкМ в 96-луночных планшетах. Растворы амидита получают в концентрации 0,1 М, этилтиотетразол (0,6 М в ацетонитриле) применяют в качестве активатора.

Синтезированные последовательности расщепляют и снимают защиту в 96-луночных планшетах, используя метиламин на первой стадии и фторидный реагент на второй стадии. Неочищенные последовательности осаждают, используя смесь ацетон:этанол (80:20), и осадки ресуспендируют в буфере 0,2 М натрия ацетата. Образцы из каждой последовательности анализируют с помощью жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии для подтверждения идентичности, УФ для количественной оценки и отобранную группу образцов - с помощью ионообменной хроматографии для определения чистоты.

Очистка и обессоливание.

Последовательности Beta-ENaC очищают в системе очистки АКТА explorer с колонкой Source 15Q. Температуру колонки 65°C поддерживают на протяжении всей очистки. Закаливание и сбор образцов проводят в 96-луночном планшете (глубина лунок 1,8 мл). Единственный пик, соответствующий последовательности полной длины, отбирают в элюенте. Очищенные последовательности обессоливают в колонке Sephadex G25, используя систему очистки АКТА. Обессоленные последовательности Beta-ENaC исследуют, определяя концентрацию (путем УФ-измерения при A260) и чистоту (с помощью ионообменной ВЭЖХ).

Отдельные цепочки затем исследуют путем отжига.

Подробный перечень отдельных цепей и дуплексов Beta-ENaC представлен в табл. 1. Дуплексы применяют для скрининга *in vitro* для анализа их способности вызывать нокдаун уровня гена Beta-ENaC.

Пример 3. *In vitro* скрининг агентов РНКи к Beta-ENaC.

Агенты РНКи к Beta-ENaC подвергают скринингу *in vitro* для определения их способности вызывать нокдаун уровня гена Beta-ENaC.

Культуры клеток и трансфекция.

Клетки H441 (фирма ATCC, Manassas, Вирджиния) выращивают почти до полного слияния при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в среде RPMI 1640 (фирма ATCC), обогащенной 10% ФСТ, стрептомицином и глутамином (фирма ATCC) перед высвобождением из планшета путем трипсинизации. Обратную трансфекцию проводят путем добавления 5 мкл Opti-MEM к 5 мкл дуплексов миРНК на лунку в 96-луночном планшете наряду с 10 мкл Opti-MEM плюс 0,2 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (фирма Invitrogen, Carlsbad, Калифорния, номер в каталоге 13778-150) и инкубируют при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем добавляют 80 мкл полноценной культуральной среды без антибиотика, содержащей 2,0×10⁴ клеток H441. Клетки инкубируют в течение 24 ч до очистки РНК. Эксперименты проводят при конечной концентрации дуплекса 0,1 или 10 нМ для отдельных доз скрининга с каждым из 55 Beta-ENaC дуплексов. Каждую миРНК трансфицируют трижды в каждой из исследуемых доз. Результаты приведены в табл. 3.

Подгруппы дуплексов, которые показывают четкое глушение при анализе 10 и 0,1 нМ, изучают в диапазоне концентраций от 10 нМ до 10 фМ, используя серийные разведения для определения величин IC₅₀. Результаты приведены в табл. 4.

Выделение суммарной РНК.

Клетки собирают и лизируют в 140 мкл лизирующего/связывающего раствора, затем перемешивают в течение 1 мин в режиме 850 об/мин, используя термомиксер Eppendorf (скорость перемешивания постоянна на протяжении процесса).

Набор для выделения суммарной РНК MagMAX-96 (фирма Applied Biosystem, Foster City, Калифорния, партия AM1830) применяют для выделения суммарной РНК. 20 мкл магнитных гранул и смесь для усиления лизиса/связывания добавляют к клеткам-лизату и перемешивают в течение 5 мин. Магнитные гранулы захватывают, используя магнитную подставку, и супернатант удаляют, не взбалтывая гранулы. После удаления супернатанта магнитные гранулы промывают раствором для промывки 1 (добавленный пропанол) и перемешивают в течение 1 мин. Гранулы захватывают еще раз и удаляют супернатант. Затем гранулы промывают с помощью 150 мкл раствора для промывки 2 (добавленный этанол), захватывают и удаляют супернатант. Затем к гранулам добавляют 50 мкл смеси ДНазы (буфер MagMax

turbo DNase Buffer и Turbo DNase) и перемешивают в течение 10-15 мин. После перемешивания добавляют 100 мкл раствора для повторного связывания РНК и перемешивают в течение 3 мин. Супернатант удаляют и магнитные гранулы промывают еще раз с помощью 150 мкл раствора для промывки 2 и перемешивают в течение 1 мин, супернатант полностью удаляют. Магнитные гранулы перемешивают в течение 2 мин для высушивания перед элюцией РНК с помощью 50 мкл воды.

Синтез кДНК.

Набор обратной транскрипции кДНК высокой емкости ABI (фирма Applied Biosystems, Foster City, Калифорния, номер в каталоге 4368813) применяют для синтеза кДНК. Основную смесь, включающую 2 мкл 10X буфера, 0,8 мкл 25X дезоксирибонуклеотидтрифосфатот (dNTP), 2 мкл случайных праймеров, 1 мкл обратной транскриптазы, 1 мкл ингибитора РНазы и 3,2 мкл H₂O на реакцию добавляют к 10 мкл суммарной РНК. Получают кДНК, используя термальный цикл Bio-Rad C-1000 или S-1000 (фирма Hercules, Калифорния) из следующих стадий: 25°C 10 мин, 37°C 120 мин, 85°C 5 с, выдержка при 4°C.

ПЦР реального времени.

2 мкл кДНК добавляют к мастер-микс, содержащей 0,5 мкл GAPDH TaqMan Probe (фирма Applied Biosystems, номер в каталоге 4326317E), 0,5 мкл Beta-ENaC TaqMan Probe (фирма Applied Biosystems, номер в каталоге Hs00165722_m1) и 5 мкл мастер-микса Roche Probes Master Mix (фирма Roche, номер в каталоге 04887301001) в общем объеме 10 мкл на лунку в 384-луночный планшет LightCycler 480 (фирма Roche, номер в каталоге 0472974001). ПЦР реального времени проводят в приборе LightCycler 480 ПЦР реального времени (фирма Roche). Каждый дуплекс исследуют в двух независимых трансфекциях и каждую трансфекцию исследуют в двух повторах.

Данные ПЦР реального времени анализируют, используя метод $\Delta\Delta C_t$. Каждый образец нормализуют по экспрессии GAPDH и нокдаун оценивают относительно клеток, трансфицированных не нацеливаемым на мишень дуплексом AD-1955. Величины IC₅₀ обозначают, используя модель выравнивания по четырем параметрам по программе XLfit.

Результаты приведены ниже. Табл. 3 показывает результаты экспериментов, проведенных с итоговыми дуплексами в концентрации 0,1 или 10 нМ для скрининга отдельных доз с каждым из 55 дуплексов Beta-ENaC. Понятие "сохранение информации по фракциям" показывает остаточный генный уровень при дозе 10 или 0,1 нМ. Таким образом, величина "0,17" во второй колонке для AD-20832-b1 означает, что в концентрации 10 нМ имеется остаточный генный уровень 17% или нокдаун экспрессии на 83%. Следует отметить, что суффикс "b1" означает "партию 1". Таким образом, например, агент РНКи с обозначением "AD-20832-b1" имеет ту же последовательность, что и агент РНКи, обозначенный "AD-20832".

Таблица 3

Нокдаун Beta-ENaC дозами 10 и 0,1 нМ

	Сохранение информации по фракциям в дозе 10 нМ	Сохранение информации по фракциям в дозе 0,1 нМ	Стандартное отклонение в дозе 10 нМ	Стандартное отклонение в дозе 0,1 нМ
AD-20832-b1	0,17	0,33	0,04	0,03
AD-20848-b1	0,17	0,49	0,01	0,04
AD-20807-b1	0,18	0,26	0,02	0,05
AD-20826-b1	0,19	0,49	0,02	0,22
AD-20837-b1	0,19	0,51	0,04	0,04
AD-20861-b1	0,19	0,71	0,02	0,29
AD-20834-b1	0,20	0,34	0,06	0,05
AD-20806-b1	0,22	0,60	0,02	0,15
AD-20851-b1	0,23	0,55	0,04	0,07
AD-20865-b1	0,24	0,64	0,02	0,05
AD-20811-b1	0,25	0,52	0,17	0,23
AD-20819-b1	0,27	0,60	0,01	0,07
AD-20839-b1	0,27	0,55	0,06	0,05
AD-20835-b1	0,28	0,63	0,07	0,21
AD-20825-b1	0,30	0,72	0,11	0,15
AD-20867-b1	0,30	0,68	0,00	0,20
AD-20813-b1	0,34	0,56	0,17	0,36
AD-20823-b1	0,34	0,75	0,05	0,05
AD-20805-b1	0,36	0,86	0,02	0,09
AD-20831-b1	0,36	0,60	0,01	0,21
AD-20862-b1	0,38	0,93	0,02	0,29
AD-20808-b1	0,40	0,81	0,13	0,16
AD-20827-b1	0,40	2,55	0,07	1,44
AD-20828-b1	0,42	0,89	0,11	0,25
AD-20812-b1	0,47	0,74	0,32	0,36
AD-20836-b1	0,48	1,07	0,11	0,27
AD-20822-b1	0,49	0,94	0,11	0,09
AD-20810-b1	0,53	0,87	0,25	0,20
AD-20824-b1	0,54	1,12	0,08	0,33
AD-20844-b1	0,55	0,98	0,07	0,28
AD-20814-b1	0,60	1,30	0,09	0,12
AD-20838-b1	0,65	1,18	0,07	0,18
AD-20816-b1	0,66	1,38	0,05	0,17
AD-20845-b1	0,72	1,18	0,01	0,27
AD-20820-b1	0,75	0,89	0,06	0,14
AD-20830-b1	0,75	0,94	0,04	0,24
AD-20866-b1	0,77	1,24	0,03	0,57
AD-20809-b1	0,78	1,05	0,05	0,03
AD-20833-b1	0,79	0,99	0,01	0,35
AD-20821-b1	0,80	0,99	0,07	0,14
AD-20846-b1	0,83	1,13	0,10	0,15
AD-20818-b1	0,88	1,36	0,04	0,62
AD-20817-b1	0,89	1,11	0,11	0,19
AD-20843-b1	0,92	1,64	0,11	0,16
AD-20840-b1	0,93	1,13	0,15	0,30
AD-20847-b1	0,94	0,99	0,64	0,12
AD-20815-b1	0,96	2,06	0,23	0,99
AD-20842-b1	0,96	1,37	0,16	0,28
AD-20852-b1	0,96	1,30	0,17	0,17

AD-20863-b1	0,99	0,84	0,24	0,11
AD-20864-b1	0,99	1,36	0,05	0,74
AD-20850-b1	1,00	1,22	0,14	0,14
AD-20829-b1	1,08	1,39	0,26	0,70
AD-20849-b1	1,11	1,31	0,27	0,17
AD-20841-b1	1,12	1,37	0,10	0,48

Все агенты РНКи к Beta-ENaC, применяемые в этих экспериментах, являются модифицированными последовательностями (SEQ ID NO: 1-110), перечисленными в табл. 1.

Табл. 4 показывает результаты экспериментов, причем подгруппа дуплексов, которые проявляют сильное глушение при скрининге в дозах 10 и 0,1 нМ, исследуют в диапазоне концентраций от 10 нМ до 10 фМ, используя серийные разведения для определения величин IC₅₀.

Таблица 4

Поиск дозового ответа Beta-ENaC

Дуплекс_ID	H441 новые (средняя величина по 4 повторам)		H441 старые (средняя величина по 8 повторам)	
	IC ₅₀ нМ	IC ₅₀ стандартное отклонение	IC ₅₀ нМ	IC ₅₀ стандартное отклонение
AD-20807	0,05	0,03	0,04	0,06
AD-20826	0,14	0,05	0,05	0,07
AD-20832	0,05	0,02	0,04	0,05
AD-20834	0,06	0,03	0,03	0,06
AD-20848	0,25	0,14	0,13	0,17
AD-20861	0,13	0,08	0,09	0,06

Пример 4. In vivo анализ агентов РНКи к Beta-ENaC AD-20807 и AD-20832.

В экспериментах in vivo исследуют два агента РНКи к Beta-ENaC, AD-20807 и AD-20832, на способность вызывать нокдаун уровня гена Beta-ENaC в целых легких у крыс. Цель заключается в определении дозового ответа. Также исследуют иммуностимуляцию.

Используют крыс линии Sprague-Dawley; примерная масса особей составляет 280-300 г. Крыс дозируют раз в сутки на протяжении двух суток. Затем их умерщвляют примерно через 24 ч после второй дозы. Левое легкое измельчают для определения уровней бета-ENaC методом количественной ПЦР; правое легкое замораживают и хранят.

Таблица 5

Группа	Номера крыс	Состав	Концентрация	Число крыс в группе
1	1-5	D5W	-	5
2	6-10	AD1955	10 мг/кг	5
3	11-15	AD20191	10 мг/кг	5
4	16-20	AD20807	10 мг/кг	5
5	12-25	AD20807	3 мг/кг	5
6	26-30	AD20807	1 мг/кг	5
7	31-35	AD20832	10 мг/кг	4*
8	36-40	AD20832	3 мг/кг	5
9	41-45	AD20832	1 мг/кг	5

*В группе 4 пяти крысам в начальной стадии вводят дозы, но одну крысу в этой группе не используют в эксперименте и данные по этому животному не включают в заключительные результаты.

Оба агента РНКи к Beta-ENaC, AD20807 и AD20832, демонстрируют снижение уровней Beta-ENaC дозозависимым способом. В случае AD20807 уровень Beta-ENaC снижается примерно на 30, 40 и 50% в дозах 1, 3 и 10 мг/кг соответственно.

Напротив, агенты РНКи к Beta-ENaC (bENaC) не снижают уровня Alpha-ENaC (aENaC). Однако наблюдают повышение уровня Alpha-ENaC при введении AD20832.

К отрицательным контролям относятся:

D5W: раствор 5% декстрозы в воде; этот растворитель применяют для разведения миРНК при дозировании;

AD1955: миРНК, которая специфически не нацеливается ни на Alpha-, ни на Beta-ENaC, но нацеливается на люциферазу светлячка; и

AD20191: миРНК, которая специфически не связывается с Beta-ENaC, но нацеливается на Alpha-ENaC крысы; и

агент AD-9201, который нацеливается на Alpha-ENaC (не применяют в этом конкретном примере).

Таким образом, специфический нокдаун Beta-ENaC отмечают в данном эксперименте с агентами РНКи AD20807 и AD20832.

Пример 5. In vivo анализ Beta-ENaC AD-20834.

В экспериментах in vivo агент РНКи к Beta-ENaC AD20834 исследуют на способность вызывать нокдаун уровня гена Beta-ENaC в целых легких у крыс. Цель заключается в определении дозового ответа. Также исследуют иммуностимуляцию.

Используют крыс линии Sprague-Dawley; примерная масса особей составляет 280-300 г. Крыс дозируют раз в сутки на протяжении двух суток. Затем их умерщвляют примерно через 24 ч после второй дозы. Левое легкое удаляют и измельчают для определения уровней бета-ENaC методом количественной ПЦР; правое легкое замораживают и хранят.

Таблица 6

Группа	Номера крыс	Состав	Концентрация	Число крыс в группе
1	1-5	D5W	-	5
2	6-10	AD1955	10 мг/кг	4*
3	11-15	AD20191	10 мг/кг	5
4	16-20	AD20834	10 мг/кг	5
5	21-25	AD20834	1 мг/кг	5
6	26-30	AD20834	3 мг/кг	4*

*В группе 4 пяти крысам в начальной стадии вводят дозы, но одну крысу в этой группе не используют в эксперименте и данные по этому животному не включают в заключительные результаты.

Оба агента РНКи к Beta-ENaC, AD20807 и AD20832, демонстрируют снижение уровней Beta-ENaC дозозависимым способом. В случае AD20807 уровень Beta-ENaC снижается примерно на 30, 40 и 50% в дозах 1, 3 и 10 мг/кг соответственно.

Напротив, агенты РНКи к Beta-ENaC (bENaC) не снижают уровня Alpha-ENaC (aENaC). Однако наблюдают повышение уровня Alpha-ENaC при введении AD20832.

При массе тела 300 г (0,3 кг) проводят следующие разведения:

10 мг/кг = 3 мг миРНК в объеме 200 мкл = 15 мг/мл;

3 мг/кг = 1 мг миРНК в объеме 200 мкл = 5 мг/мл;

1 мг/кг = 0,3 мг миРНК в объеме 200 мкл = 1,5 мг/мл.

Данные нормализуют по гену PPIB [ген Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B - ген пептидилпропил-цис-транс-изомеразы B, применяемый в качестве гена housekeeping (нормализация)].

Эти эксперименты показывают, что агент РНКи к Beta-ENaC AD20834 проявляет снижение уровня Beta-ENaC примерно на 40% у крыс линии Sprague-Dawley. Этот эффект специфичен для Beta-ENaC.

Применяют следующие контроли: D5W (5% dextrose in water - раствор 5% декстрозы в воде) применяют в качестве отрицательного контроля, не оказывающего воздействия на уровни Alpha-ENaC или Beta-ENaC. AD1955, контрольная миРНК, которая не связывается с Alpha- или Beta-ENaC, также показывающая слабое воздействие на уровень Alpha- или Beta-ENaC. Положительный контроль миРНК AD20191, который нацеливается на Alpha-ENaC, но не на Beta-ENaC, показывает примерно 50% снижение уровня Alpha-ENaC, но не уровня Beta-ENaC.

Таким образом, доза 10 мг/кг агента РНКи к Beta-ENaC AD20834 показывает по меньшей мере примерно 40% подавление экспрессии гена Beta-ENaC в крысах Sprague-Dawley.

Пример 6. Анализ агентов РНКи к Beta-ENaC.

Дополнительные эксперименты проводят с агентами РНКи к Beta-ENaC AD20807, AD20832, AD20834, AD20848 и AD20861 in vivo в крысах Sprague-Dawley. Крысам вводят дозу 10 мг/кг в D5W на 1 и 2 сутки, на 3 сутки их умерщвляют и берут на анализ легкие.

Результаты показаны на фиг. 1. Результаты показывают данные кПЦР по левому легкому, нормализованные относительно контрольного гена PPIB.

Контроли на фиг. 1 следующие: D5W (5% dextrose in water - 5% глюкоза в воде) представляет отрицательный контроль, не показывающий воздействия на уровни Alpha-ENaC или Beta-ENaC. Положительным контролем является агент AD-9201, который нацеливается на Alpha-ENaC (aENaC).

Результаты, представленные на фиг. 1, показывают статистическую значимость и специфический нокдаун Beta-ENaC (bENaC) под действием AD20807, AD20832, AD20834, AD20848 и AD20861. Экспрессия гена Beta-ENaC подавляется по меньшей мере примерно на 40% под действием концентрации 10 мг/кг таких агентов РНКи в крысах Sprague-Dawley.

Пример 7. In vitro эффект агента РНКи к Beta-ENaC AD20832 на действие функционального канала ENaC в бронхиальных эпителиальных клетках человека.

Клетки бронхиального эпителия человека (Human Bronchial Epithelial Cells -HBEC) трансфицируют номинальной миРНК, включающей агент РНКи к Beta-ENaC AD20832. Трансфицированные клетки высевают на инсертах клеточной культуры Snapwell и культивируют в течение 24 ч. Затем верхний слой культуральной среды удаляют от каждого инсерта и клетки культивируют на разделе воздушной и жидкой сред (ВЖС). Клетки исследуют на действие ENaC и CFTR на 8 сутки пост-ВЖС согласно описанному. Для контроля жизнеспособности клеточной функции ENaC нормализуют по действию CFTR и полученные данные представляют в виде процента относительно контроля, не подвергнувшегося трансфекции (фиг. 2A). В качестве дополнительного контроля жизнеспособности также измеряют трансмембранное

сопротивление (фиг. 2Б). Анализ экспрессии иРНК субъединиц alpha и beta ENaC проводят для каждого инсера и нормализуют по экспрессии GAPDH. (Фиг. 2В). Эти данные показывают, что подавление экспрессии иРНК на 70% достаточно для выработки функционального подавления на 50% канала ENaC. Это справедливо для нокдауна или альфа, или бета субъединиц, если каждую сравнивают с нетрансфицированными (neg) и неспецифичными (ns) контролями миРНК. Эти данные также показывают, что миРНК Beta-ENaC не подавляет экспрессию иРНК alpha-ENaC, и наоборот.

Способы: функциональное действие ENaC в клетках бронхиального эпителия человека.

Используют клетки бронхиального эпителия человека (Human Bronchial Epithelial Cells - HBEC) фирмы Lonza и один раз пересевают до замораживания в ростовой среде (среда BEGM plus singlequots фирмы Lonza). Впоследствии клетки оттаивают, размножают до слияния и расщепляют 1:10 для трансфекции. При достижении 80% слияния каждый флакон с клетками трансфицируют соответствующей миРНК в концентрации 30 нМ, используя 2 мкл/мл Lipofectamine 2000 в общем объеме 30 мл среды для трансфекции (смесь 1:1 BEGM (фирма Lonza) и DMEM с высоким содержанием глюкозы (фирма Gibco) без добавок). Через 24 ч после трансфекции клетки высевают в 6-луночных инсерах Snapwell (фирма Costar) в количестве $2,5 \times 10^5$ клеток/инсерт в среде для дифференциации (смесь 50:50 BEBM и DMEM с высоким содержанием глюкозы с компонентами singlequots (минус добавки три-йодтреонина и ретиноевой кислоты, с отдельно добавленной полностью трансретиноевой кислотой в количестве 50 нМ). К клеткам сверху добавляют 0,5 мл дифференцирующей среды и базолатерально 2,5 мл дифференцирующей среды. Еще через 24 ч культивирования на инсерах базолатеральную среду замещают и апикальную среду удаляют, таким образом клетки становятся культурой на разделе воздушной и жидкой сред (ВЖС). Клетки исследуют на ENaC и CFTR действие на 8 сутки пост-ВЖС. Для оценки фенотипа ионного транспорта у трансфицированных клеток инсерты Snapwell выдерживают в камерах вертикальной диффузии (фирма Costar), постоянно промывают газированным раствором Рингера (5% CO₂ в O₂; pH 7,4) и поддерживают при 37°C, содержащем (мМ): 120 NaCl, 25 NaHCO₃, 3,3 KH₂PO₄, 0,8 K₂HPO₄, 1,2 CaCl₂, 1,2 MgCl₂ и 10 глюкозы (величину осмолярности поддерживают между 280 и 300 мосмол/л). Фиксируют напряжение клеток до 0 мВ (модель EVC4000 фирмы WPI). Трансмембранное сопротивление (TM res) измеряют, применяя импульсы 2-мВ с интервалами 30 с, и рассчитывают TM res по закону Ома. Данные по току короткого замыкания записывают, используя зарядное устройство PowerLab (фирма ADI Instruments). Действие канала ENaC в каждой группе оценивают по изменению тока короткого замыкания после апикального добавления 10 мкМ блокатора ENaC амилорида (амилорид-чувствительный ток). Секрецию хлорида через CFTR оценивают по изменению тока короткого замыкания после апикального и базолатерального добавления 0,6 мкМ форсколина, о котором известно, что он активирует CFTR (форсколиновый ответ). Для каждого инсера амилорид-чувствительный ток нормализуют по форсколиновому ответу и данные представляют в виде процента относительно нетрансфицированного контроля. К концу исследования каждый инсерт лизируют для анализа РНК (300 мкл буфера RLT фирмы Qiagen) и образцы оставляют для последующего анализа нокдауна иРНК методом рв-ПЦР согласно описанному.

Аббревиатуры:

ВЖС - раздел воздушной и жидкой сред;

BEGM (Bronchial Epithelial Growth Medium) - среда для роста бронхиального эпителия;

D6, D8 (Day 6, Day 8) Шестые сутки, восьмые сутки;

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) - модифицированная среда Дульбекко-Игла;

HBEC (Human Bronchial Epithelial Cells) - клетки бронхиального эпителия человека;

TM res (Trans-membrane resistance) – т.рансмембранное сопротивление.

Эквиваленты.

[1]. Композиция, включающая агент РНКи, содержащий смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи агента РНКи, специфичного к Beta-ENaC, предусмотренного в табл.1.

Композиция по параграфу [1], которая дополнительно включает второй агент РНКи к Beta-ENaC.

Композиция по параграфу [1], в которой антисмысловая цепь имеет в длину 30 или менее нуклеотидов.

Композиция по параграфу [1], в которой смысловая цепь и антисмысловая цепь формируют область дуплекса из 15-30 пар нуклеотидов в длину.

Композиция по параграфу [1], в которой антисмысловая цепь и смысловая цепь независимо имеют 19-23 нуклеотида в длину.

Композиция по параграфу [1], в которой агент РНКи включает модификацию, которая повышает стабильность агента РНКи в биологическом образце или в среде.

Композиция по параграфу [1], в которой агент РНКи включает по меньшей мере один модифицированный каркас молекулы и/или по меньшей мере один 2'-модифицированный нуклеотид.

Композиция по параграфу [1], в которой агент РНКи включает:

а) по меньшей мере один 5'-уридин-аденин-3' (5'-ua-3') динуклеотид, в котором уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом; и/или

б) по меньшей мере один 5'-уридин-гуанин-3' (5'-ug-3') динуклеотид, в котором 5'-уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом; и/или

в) по меньшей мере один 5'-цитидин-аденин-3' (5'-ca-3') динуклеотид, в котором 5'-цитидин является 2'-модифицированным нуклеотидом; и/или

г) по меньшей мере один 5'-уридин-уридин-3' (5'-uu-3') динуклеотид, в котором 5'-уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом.

Композиция по параграфу [1], в которой агент РНКи включает 2'-модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-дезоксидеокси, 2'-дезоксидеокси-2'-фтор, 2'-О-метил, 2'-О-метоксиэтил (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропил (2'-О-АР), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил (2'-О-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-О-DMAEOE) и 2'-О-N-метилацетиламино (2'-О-NMA).

Композиция по параграфу [1], в которой агент РНКи содержит тупой конец.

Композиция по параграфу [1], в которой агент РНКи включает выступ из 1-4 неспаренных нуклеотидов.

Композиция по параграфу [1], в которой агент РНКи включает выступ с 3'-конца антисмысловой цепи агента РНКи.

Композиция по параграфу [1], в которой агент РНКи лигирован с одним или несколькими агентами, выбранными из диагностического соединения, репортерной группы, агента перекрестного связывания, определяющей резистентность к нуклеазе части молекулы, природного или необычного нуклеинового основания, липофильной молекулы, холестерина, липида, лектина, стероида, уваола, гецигенина, диосгенина, терпена, тритерпена, сарсасапогенина, фрайделина, дериватизированной эпифрайделанолом литохалиевой кислоты, витамина, углевода, декстрана, пуллулана, хитина, хитозана, синтетического углевода, 15-мерным олиголактата, природного полимера, низкомолекулярного полимера или полимера средней молекулярной массы, инулина, циклодекстрина, гиалуроновой кислоты, белка, белок-связывающего агента, интегрин-нацеливающей молекулы, поликатионного агента, пептида, полиамина, пептидного миметика и/или трансферина.

Композиция по параграфу [1], в которой агент РНКи способен ингибировать экспрессию гена Beta-ENaC по меньшей мере примерно на 60% в концентрации 10 нМ в клетках H441 *in vitro*.

Композиция по параграфу [1], в которой агент РНКи способен ингибировать экспрессию гена Beta-ENaC по меньшей мере примерно на 70% в концентрации 10 нМ в клетках H441 *in vitro*.

Композиция по параграфу [1], в которой агент РНКи способен ингибировать экспрессию гена Beta-ENaC по меньшей мере примерно на 80% в концентрации 10 нМ в клетках H441 *in vitro*.

Композиция по параграфу [1], в которой агент РНКи способен ингибировать экспрессию гена Beta-ENaC по меньшей мере примерно на 90% в концентрации 10 нМ в клетках H441 *in vitro*.

Композиция по параграфу [1], в которой величина EC₅₀ РНКи не превышает примерно 0,1 нМ.

Композиция по параграфу [1], в которой величина EC₅₀ РНКи не превышает примерно 0,01 нМ.

Композиция по параграфу [1], в котором величина EC₅₀ у РНКи составляет примерно не более 0,001 нМ.

[2]. Композиция, включающая агент РНКи, содержащий первую цепь и вторую цепь, причем первая цепь и вторая цепь включают по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от первой и второй цепи соответственно, агента РНКи, специфичного к Beta-ENaC, предусмотренного в табл. 1.

Композиция по параграфу [2], в котором композиция включает второй агент РНКи к Beta-ENaC.

Композиция по параграфу [2], в которой вторая цепь содержит 30 или менее нуклеотидов в длину.

Композиция по параграфу [2], в которой первая цепь и вторая цепь формируют область дуплекса из 15-30 пар нуклеотидов в длину.

Композиция по параграфу [2], в которой первая цепь и вторая цепь независимо содержат 19-23 нуклеотидов в длину.

Композиция по параграфу [2], в которой агент РНКи включает модификацию, которая придает агенту РНКи повышенную стабильность в биологическом образце или в среде.

Композиция по параграфу [2], в которой агент РНКи включает фосфоротиоат и/или 2'-модифицированный нуклеотид.

Композиция по параграфу [2], в которой агент РНКи включает

по меньшей мере один 5'-уридин-аденин-3' (5'-ua-3') динуклеотид, в котором уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом; и/или по меньшей мере один 5'-уридин-гуанин-3' (5'-ug-3') динуклеотид, в котором 5'-уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом; и/или

по меньшей мере один 5'-цитидин-аденин-3' (5'-ca-3') динуклеотид, где 5'-цитидин является 2'-модифицированным нуклеотидом; и/или

по меньшей мере один 5'-уридин-уридин-3' (5'-uu-3') динуклеотид, в котором 5'-уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом.

Композиция по параграфу [2], в которой агент РНКи включает одну или несколько 2'-модификаций, выбранных из группы, состоящей из фрагментов молекулы: 2'-дезоксидеокси, 2'-дезоксидеокси-2'-фтор, 2'-О-метил, 2'-О-метоксиэтил (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропил (2'-О-АР), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-О-DMAOE),

2'-О-диметиламинопропил (2'-O-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-O-DMAEOE) и 2'-О-N-метилацетиамидо (2'-O-NMA).

Композиция по параграфу [2], в которой агент РНКи содержит тупой конец.

Композиция по параграфу [2], в которой агент РНКи содержит выступ из 1-4 неспаренных нуклеотидов.

Композиция по параграфу [2], в которой агент РНКи содержит выступ с 3'-конца антисмысловой цепи.

Композиция по параграфу [2], в которой агент РНКи лигирован с одним или несколькими агентами, выбранными из диагностического соединения, репортерной группы, агента перекрестного связывания, определяющей резистентность к нуклеазе части молекулы, природного или необычного нуклеинового основания, липофильной молекулы, холестерина, липида, лектина, стероида, уваола, гецигенина, диосгенина, терпена, тритерпена, сарсасапогенина, фрайделина, дериватизированной эпифрайделанолом литохолевой кислоты, витамина, углевода, декстрана, пуллулана, хитина, хитозана, синтетического углевода, 15-мерного олиголактата, природного полимера, низкомолекулярного полимера или полимера средней молекулярной массы, инулина, циклодекстрина, гиалуроновой кислоты, белка, белок-связывающего агента, интегрин-нацеливающей молекулы, поликатионного агента, пептида, полиамина, пептидного миметика и/или трансферина.

Композиция по параграфу [2], в которой агент РНКи способен ингибировать экспрессию гена Beta-ENaC по меньшей мере примерно на 60% в концентрации 10 нМ в клетках H441 *in vitro*.

Композиция по параграфу [2], в которой агент РНКи способен ингибировать экспрессию гена Beta-ENaC по меньшей мере примерно на 70% в концентрации 10 нМ в клетках H441 *in vitro*.

Композиция по параграфу [2], в которой агент РНКи способен ингибировать экспрессию гена Beta-ENaC по меньшей мере примерно на 80% в концентрации 10 нМ в клетках H441 *in vitro*.

Композиция по параграфу [2], в которой агент РНКи способен ингибировать экспрессию гена Beta-ENaC по меньшей мере примерно на 90% в концентрации 10 нМ в клетках H441 *in vitro*.

Композиция по параграфу [2], в которой величина EC50 РНКи не превышает примерно 0,1 нМ.

Композиция по параграфу [2], в которой величина EC50 РНКи не превышает примерно 0,01 нМ.

Композиция по параграфу [2], в которой величина EC50 РНКи не превышает примерно 0,001 нМ.

[3]. Способ лечения заболевания, связанного с Beta-ENaC, у индивидуума, включающий стадию введения индивидууму терапевтически эффективного количества композиции, содержащей агент РНКи, который включает смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи агента РНКи, специфичного к Beta-ENaC, предусмотренного в табл. 1.

Способ по параграфу [3], в котором заболеванием, связанным с Beta-ENaC, является муковисцидоз, псевдогипоальдостеронизм типа 1, синдром Лиддла, гипертония, алкалоз, гипокалиемия и/или гипертонии, связанная с ожирением.

Способ по параграфу [3], в котором заболеванием, связанным с Beta-ENaC, является муковисцидоз.

Способ по параграфу [3], который дополнительно включает стадию введения дополнительного лекарственного средства для лечения муковисцидоза, псевдогипоальдостеронизма типа 1 (ПГА1), синдрома Лиддла, гипертонии, алкалоза, гипокалиемии и/или гипертонии, связанной с ожирением.

Способ по параграфу [3], в котором композиция включает второй агент РНКи к Beta-ENaC.

Способ по параграфу [3], который дополнительно включает стадию введения дополнительного агента РНКи к Beta-ENaC.

Способ по параграфу [3], дополнительно включающий введение дополнительного лекарственного средства.

Способ по параграфу [3], в котором дополнительное лечение представляет композицию.

Способ по параграфу [3], в котором дополнительное лечение представляет способ.

Способ по параграфу [3], в котором проведение дополнительного лечения и введение агента РНКи могут осуществляться в любом порядке.

[4]. Способ подавления экспрессии гена Beta-ENaC у индивидуума, включающий стадию введения индивидууму терапевтически эффективного количества композиции, включающей агент РНКи, содержащий смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи агента РНКи, специфичного к Beta-ENaC, приведенного в табл. 1.

Способ по параграфу [4], в котором у индивидуума имеется заболевание, связанное с Beta-ENaC, или индивидуум чувствителен к этому заболеванию.

Способ по параграфу [4], в котором заболеванием, связанным с Beta-ENaC, является муковисцидоз, псевдогипоальдостеронизм типа 1 (ПГА1), синдром Лиддла, гипертония, алкалоз, гипокалиемия и/или гипертонии, связанная с ожирением.

[5]. Способ по параграфу [4], в котором заболеванием, связанным с Beta-ENaC, является муковисцидоз.

[6]. Способ по параграфу [5], включающий дополнительное лечение.

Способ по параграфу [6], в котором дополнительным лечением является введение композиции.

Способ по параграфу [6], в котором дополнительным лечением является способ.

Способ по параграфу [6], в котором дополнительное лечение и агент РНКи могут применяться в каком-либо порядке.

Лекарственное средство для применения в составе РНКи, включающее агент РНКи, содержащий смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательно расположенных нуклеотидов, отличающихся 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от антисмысловой цепи агента РНКи, специфичного к Beta-ENaC, предусмотренного в табл. 1.

Какая-либо указанная выше композиция в фармацевтически эффективном составе.

Композиция по параграфу 0, для применения в способе лечения индивидуума с заболеванием, связанным с Beta-ENaC; указанный способ включает стадию введения индивидууму терапевтически эффективного количества композиции по параграфу 0.

[0]. Применение композиции по параграфу 0, для получения лекарственного средства для лечения заболеваний, связанных с Beta-ENaC.

Применение по параграфу [7], в котором заболевание, связанное с Beta-ENaC, является муковисцидозом, псевдогипоальдостеронизмом типа 1 (ПГА РНА1), синдромом Лиддла, гипертонией, алкалозом, гипокалиемией и/или гипертонией, связанной с ожирением.

Композиция по параграфу [1], в которой все пиримидины являются 2'-О-метил-модифицированными нуклеотидами.

Композиция по параграфу [2], в которой все пиримидины являются 2-О-метил-модифицированными нуклеотидами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена Beta-ENaC, включающая

специфичный к указанному гену агент РНКи, который содержит антисмысловую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 116, 154, 166, 170, 176, 198 или 208 без нуклеотидных замен или с 1-2 нуклеотидными заменами и который содержит смысловую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 115, 153, 165, 169, 175, 197 или 207 без нуклеотидных замен или с 1-2 нуклеотидными заменами; и

фармацевтически приемлемый носитель.

2. Композиция по п.1, которая дополнительно включает второй агент РНКи к Beta-ENaC.

3. Композиция по п.1, в которой агент РНКи включает по меньшей мере одну модифицированную фосфоротиоатную связь и/или по меньшей мере один нуклеотид, модифицированный в 2'-положении сахара нуклеотида.

4. Композиция по п.1, в которой агент РНКи ковалентно связан по меньшей мере с одним агентом, выбранным из диагностического соединения, репортерной группы, агента перекрестного связывания, группы, сообщающей резистентность к нуклеазе, природного или необычного нуклеинового основания, липофильной молекулы, холестерина, липида, лектина, стероида, уваола, гецигенина, диосгенина, терпена, тритерпена, сарсасапогенина, фрайделина, дериватизированной эпифрайделанолом литохолиевой кислоты, витамина, углевода, декстрана, пуллулана, хитина, хитозана, синтетического углевода, 15-мерного олиголактата, природного полимера, низкомолекулярного полимера или полимера средней молекулярной массы, инулина, циклодекстрина, гиалуриновой кислоты, белка, белок-связывающего агента, интегрин-нацеливающей молекулы, поликатионного агента, пептида, полиамина, пептидного миметика и трансферина.

5. Композиция по п.1, в которой все пиримидины являются 2'-О-метил-модифицированными нуклеотидами.

6. Способ лечения патологического состояния, опосредованного, по меньшей мере частично, экспрессией гена Beta-ENaC у индивидуума, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп.1-5.

7. Способ по п.6, в котором патологическое состояние, опосредованное, по меньшей мере частично, экспрессией гена Beta-ENaC, представляет собой муковисцидоз, псевдогипоальдостеронизм типа 1, синдром Лиддла, гипертонию, алкалоз, гипокалиемию и/или гипертонию, связанную с ожирением.

8. Способ по п.7, включающий осуществление дополнительного лечения муковисцидоза, псевдогипоальдостеронизма типа 1, синдрома Лиддла, гипертонии, алкалоза, гипокалиемии и/или гипертонии, связанной с ожирением, где указанное дополнительное лечение включает введение второго агента РНКи к Beta-ENaC.

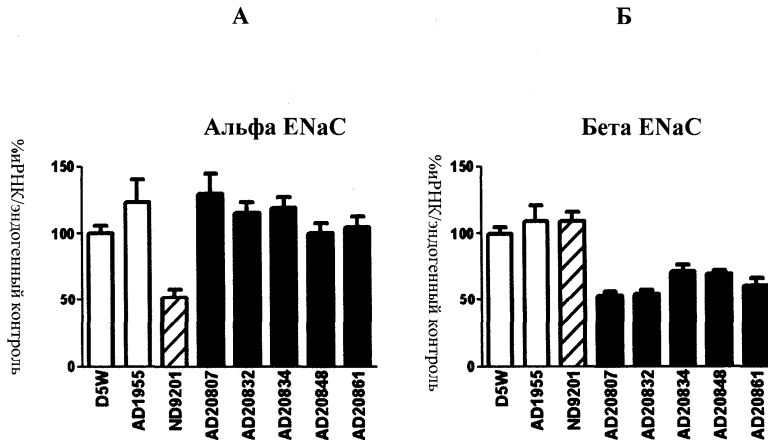
9. Способ подавления экспрессии гена Beta-ENaC у индивидуума, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп.1-5.

10. Способ по п.9, который дополнительно включает введение второго агента РНКи к Beta-ENaC.

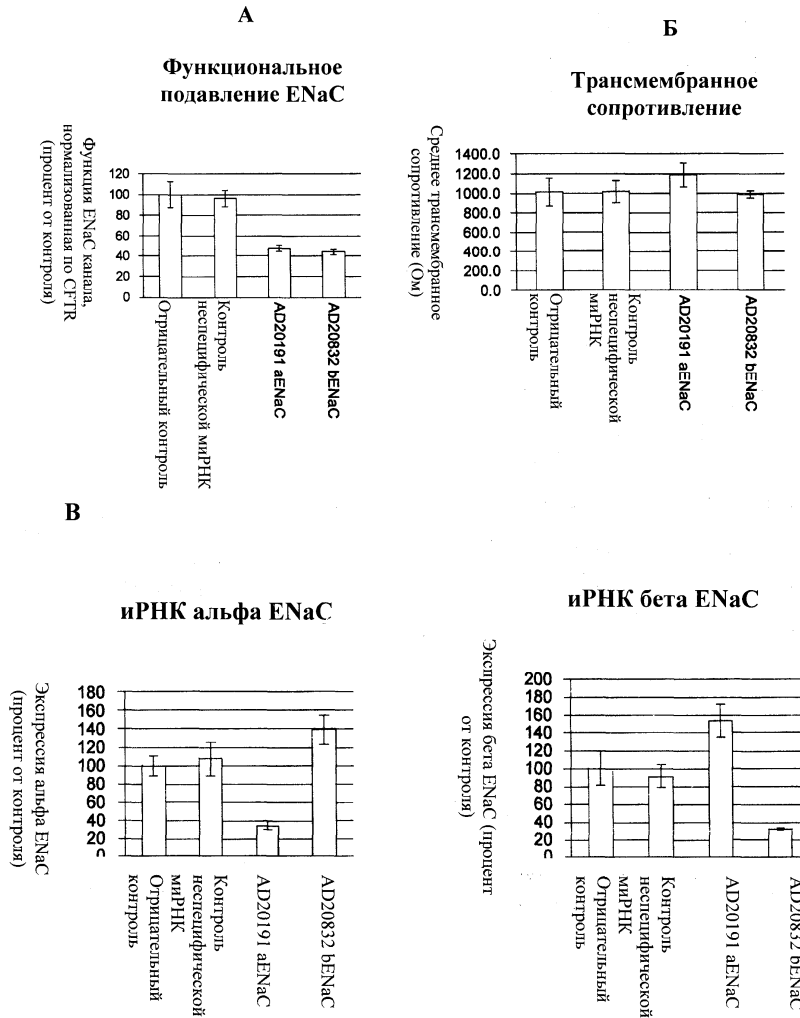
11. Применение композиции по п.1 для лечения патологического состояния, опосредованного, по

меньшей мере частично, экспрессией гена Beta-ENaC у индивидуума.

12. Применение композиции по п.1 для получения лекарственного средства для лечения патологического состояния, опосредованного, по меньшей мере частично, экспрессией гена Beta-ENaC.



Фиг. 1



Фиг. 2

