

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390051** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.10.31

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.05.22

(54) **КОМПОЗИЦИИ и РНК АНГИОТЕНЗИНОГЕНА (AGT) И СПОСОБЫ ИХ
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

(31) **62/001,731; 62/047,978**

(32) **2014.05.22; 2014.09.09**

(33) **US**

(62) **201692370; 2015.05.22**

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

(72) Изобретатель:

**Фостер Дональд, Беттенкорт Брайан,
Хариссе Клаус, Хинкл Грегори,
Кучиманчи Сатиянараяна, Майер
Мартин, Милстейн Стюарт (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к РНКи средствам, например к средствам из двухцепочечной РНКи, направленной на ген ангиотензиноген (AGT), и к способам использования таких РНКи средств для того, чтобы ингибировать экспрессию AGT, и к способам лечения субъектов, имеющих AGT-ассоциированное нарушение, например гипертензию.

A1

202390051

202390051

A1

**КОМПОЗИЦИИ ИРНК АНГИОТЕНЗИНОГЕНА (АГТ) И СПОСОБЫ ИХ
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

Перекрестная ссылка на связанные заявки

По данной заявке испрашивают преимущество приоритета предварительной заявки США № 62/001,731, поданной 22 мая 2014 года, и предварительной заявки США № 62/047978, поданной 9 сентября 2014 года. Полное содержание каждой из приведенных выше заявок настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Список последовательностей

Данная заявка содержит список последовательностей, который подан в электронной форме в формате ASCII и настоящим включен посредством ссылки в полном объеме. Копия ASCII, созданная 18 мая 2015 года, имеет имя 121301-01320_SL.txt и размер 318688 байтов.

Предпосылки изобретения

Ренин-ангиотензин-альдостероновая система (RAAS) играет ключевую роль в регуляции кровяного давления. Каскад RAAS начинается с высвобождения ренина юкстагломерулярными клетками почки в циркуляцию. Секретию ренина стимулируют несколько факторов, включая нагрузку Na^+ в дистальном канальце, β -симпатическую стимуляцию и/или сниженную почечную перфузию. Активный ренин в плазме расщепляет ангиотензиноген (продуцируемый печенью) до ангиотензина I, который превращается циркулирующим и локально экспрессированным ангиотензин-превращающим ферментом (АСЕ) в ангиотензин II. Большинство эффектов ангиотензина II, оказываемых на RAAS, проявляется посредством его связывания с рецепторами ангиотензина II 1-го типа (AT_1R), которое ведет к артериальной вазоконстрикции, канальцевым и клубочковым эффектам, таким как усиленная реабсорбция Na^+ или модуляция уровня клубочковой фильтрации. Кроме того, вместе с другими стимулами, такими как адренокортикотропин, антидиуретический гормон, катехоламины, эндотелин, серотонин и уровни Mg^{2+} и K^+ , стимуляция AT_1R ведет к высвобождению альдостерона, которое, в свою очередь,

способствует экскреции Na^+ и K^+ в почечном дистальном извитом канальце.

Нарушение регуляции RAAS, ведущее, например, к чрезмерному образованию ангиотензина II и/или стимуляции AT_1R , ведет к гипертензии, которая может вести, например, к повышенному окислительному стрессу, содействовать воспалению, гипертрофии и фиброзу в сердце, почках и артериях, и ведет, например, к фиброзу левого желудочка, ремоделированию артерий и гломерулосклерозу.

Гипертензия представляет собой наиболее преобладающее контролируемое заболевание в развитых странах, которое поражает 20–50% взрослой популяции. Она является основным фактором риска для различных заболеваний, нарушений и состояний, таких как укороченная ожидаемая продолжительность жизни, хроническая почечная недостаточность, инсульт, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, аневризмы (например, аневризма аорты), заболевания периферических артерий, повреждение сердца (например, увеличение или гипертрофия сердца) и другие заболевания, нарушения и/или состояния, связанные с сердечнососудистой системой. Кроме того, показано, что гипертензия является важным фактором риска для сердечнососудистой заболеваемости и смертности, насчитывающих или составляющих 62% от всех инсультов и 49% от всех случаев заболеваний сердца.

Несмотря на множество антигипертензивных лекарственных средств, доступных для лечения гипертензии, больше чем у двух третей субъектов не осуществляется контроль с использованием одного антигипертензивного средства и необходимо два или более антигипертензивных средств, выбранных из различных классов лекарственных средств. Это дополнительно снижает число субъектов с контролируемым кровяным давлением, поскольку приверженность и побочные эффекты возрастают с увеличением лекарственного лечения.

Соответственно, существует необходимость в данной области в альтернативной терапии и альтернативных способах комбинированного лечения для субъектов, имеющих заболевание,

ассоциированное с ангиотензиногеном.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение предусматривает композиции иРНК, которые вызывают опосредованное РНК-индуцируемым комплексом выключения гена (RISC) расщепление РНК транскриптов гена ангиотензиногена (AGT). Ген AGT может находиться внутри клетки, например, клетки внутри субъекта, такого как человек.

Настоящее изобретение также относится к способам и терапии для лечения субъекта, имеющего нарушение, для которого будет полезно ингибирование или снижение экспрессии гена AGT, например, заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, такое как гипертензия, с использованием композиций иРНК, которые вызывают опосредованное РНК-индуцируемым комплексом выключения гена (RISC) расщепление РНК транскриптов гена AGT для ингибирования экспрессии гена AGT.

Соответственно, в одном из аспектов, настоящее изобретение предусматривает средства из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) для ингибирования экспрессии ангиотензиногена (AGT), которые содержат смысловую цепь и антисмысловую цепь, формирующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID № 1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID № 2, где по существу все нуклеотиды смысловой цепи и по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды, и где смысловую цепь конъюгируют с лигандом, прикрепленным к 3'-концу. В одном из вариантов осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает средства из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) для ингибирования экспрессии ангиотензиногена (AGT), которые

содержат смысловую цепь и антисмысловую цепь, формирующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 3 нуклеотида от нуклеотидов 2801-2101; 803-843; 834-859; 803-859; 803-875; 834-875; 847-875; 1247-1271; 1566-1624; 1570-1624; 1584-1624; 1584-1624; 1584-1621; 2035-2144; 2070-2144; 2070-2103; 2201-2223; 2227-2360; 2227-2304; 2290-2318; 2304-2350; 2304-2326; 2320-2342; 2333-2360; 2333-2358; 485-503; 517-535; 560-578; 635-653; 803-821; 814-832; 822-840; 825-843; 834-852; 837-855; 841-859; 855-873; 967-985; 1247-1265; 1248-1266; 1249-1267; 1251-1269; 1253-1271; 1566-1584; 1570-1588; 1572-1590; 1574-1592; 1584-1602; 1587-1605; 1591-1609; 1592-1610; 1595-1613; 1601-1619; 1602-1620; 1605-1623; 1729-1747; 1738-1756; 1739-1757; 1741-1769; 1767-1785; 1810-1828; 1827-1845; 1880-1989; 1892-1914; 1894-1914; 1894-2012; 2035-2053; 2046-2064; 2057-2075; 2070-2088; 2072-2090; 2078-2096; 2078-2107; 2078-2011; 2080-2098; 2081-2099; 2081-2104; 2081-2011; 2082-2100; 2084-2102; 2084-2011; 2090-2108; 2100-2118; 2111-2129; 2124-2142; 2125-2143; 2167-2185; 2179-2197; 2201-2219; 2202-2220; 2203-2221; 2204-2222; 2227-2245; 2230-2248; 2234-2252; 2244-2264; 2255-2273; 2266-2284; 2268-2286; 2270-2288; 2279-2297; 2281-2299; 2283-2301; 2284-2302; 2285-2303; 2286-2304; 2288-2306; 2290-2308; 2291-2309; 2291-2311; 2291-2318; 2291-2315; 2292-2310; 2294-2312; 2296-2314; 2299-2317; 2304-2322; 2304-2329; 2306-2324; 2307-2325; 2309-2327; 2309-2329; 2309-2342; 2309-2350; 2309-2358; 2314-2332; 2316-2334; 2317-2335; 2320-2338; 2321-2339; 2323-2341; 2325-2343; 2326-2344; 2328-2346; 2329-2347; 2331-2349; 2333-2351; 2334-2352; 2335-2353; 2339-2357; 2340-2358; или 2341-2359 из нуклеотидной последовательности SEQ ID № 1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 3 нуклеотида от нуклеотидов в соответствующем положении нуклеотидной последовательности SEQ ID № 2, так что антисмысловая цепь по существу комплементарна по меньшей мере 15 непрерывным нуклеотидам в смысловой цепи. В определенных вариантах осуществления по существу все нуклеотиды смысловой

цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды. В других вариантах осуществления по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды. В других вариантах осуществления по существу все нуклеотиды обеих цепей представляют собой модифицированные нуклеотиды. В одном из вариантов осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды. В одном из вариантов осуществления смысловую цепь конъюгируют с лигандом, прикрепленным к 3'-концу. В одном из вариантов осуществления смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 3 нуклеотида от нуклеотидов 2801-2101 нуклеотидной последовательности SEQ ID № 1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 3 нуклеотида от нуклеотидов в соответствующем положении нуклеотидной последовательности SEQ ID № 2, так что антисмысловая цепь по существу комплементарна по меньшей мере 15 непрерывным нуклеотидам в смысловой цепи.

В одном из аспектов, настоящее изобретение предусматривает средства из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) для ингибирования экспрессии ангиотензиногена (AGT), которые содержат смысловую цепь и антисмысловую цепь, формирующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов из нуклеотидов 803-843; 834-859; 803-859; 1247-1271; 1566-1624; 1570-1624; 1584-1624; 1584-1624; 1584-1621; 2035-2144; 2070-2144; 2070-2103; 2201-2223; 2227-2360; 2227-2304; 2290-2318; 2304-2350; 2304-2326; 2320-2342; 2333-2360; 2333-2358; 485-503; 517-535; 560-578; 635-653; 803-821; 814-832; 822-840; 825-843; 834-852; 837-855; 841-859; 855-873; 967-985; 1247-1265; 1248-1266; 1249-1267; 1251-1269; 1253-1271; 1566-1584; 1570-1588; 1572-1590; 1574-1592; 1584-1602; 1587-1605; 1591-1609; 1592-1610; 1595-1613; 1601-1619; 1602-1620; 1605-1623; 1729-1747; 1738-1756; 1739-1757; 1741-1769; 1767-1785; 1810-1828; 1827-1845; 1880-1989; 1894-2012; 2035-2053; 2046-2064; 2057-2075; 2070-2088; 2072-2090; 2078-2096;

2080-2098; 2081-2099; 2082-2100; 2084-2102; 2090-2108; 2100-2118; 2111-2129; 2124-2142; 2125-2143; 2167-2185; 2179-2197; 2201-2219; 2202-2220; 2203-2221; 2204-2222; 2227-2245; 2230-2248; 2234-2252; 2244-2264; 2255-2273; 2266-2284; 2268-2286; 2270-2288; 2279-2297; 2281-2299; 2283-2301; 2284-2302; 2285-2303; 2286-2304; 2288-2306; 2290-2308; 2291-2309; 2292-2310; 2294-2312; 2296-2314; 2299-2317; 2304-2322; 2306-2324; 2307-2325; 2309-2327; 2314-2332; 2316-2334; 2317-2335; 2320-2338; 2321-2339; 2323-2341; 2325-2343; 2326-2344; 2328-2346; 2329-2347; 2331-2349; 2333-2351; 2334-2352; 2335-2353; 2339-2357; 2340-2358; или 2341-2359 нуклеотидной последовательности SEQ ID № 1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 3 нуклеотида от нуклеотидов в соответствующем положении нуклеотидной последовательности SEQ ID № 2, так что антисмысловая цепь по существу комплементарна по меньшей мере 15 непрерывным нуклеотидам в смысловой цепи. В определенных вариантах осуществления по существу все нуклеотиды смысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды. В других вариантах осуществления по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды. В других вариантах осуществления по существу все нуклеотиды обеих цепей представляют собой модифицированные нуклеотиды. В одном из вариантов осуществления смысловую цепь конъюгируют с лигандом, прикрепленным к 3'-концу.

В одном из вариантов осуществления смысловая цепь и антисмысловая цепь содержит область комплементарности, которая содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 3 нуклеотида от какой-либо одной из антисмысловых последовательностей, перечисленных в какой-либо одной из таблиц 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15. Например, в определенных вариантах осуществления смысловая цепь и антисмысловая цепь содержит область комплементарности, которая содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 3 нуклеотида от какой-либо одной

из антисмысловых последовательностей дуплексов AD-52433.1, AD-52438.1, AD-52439.1, AD-52445.1, AD-52449.1, AD-52451.1, AD-52456.1, AD-52457.1, AD-52462.1, AD-52463.1, AD-52469.1, AD-52474.1, AD-55976.1, AD-55978.1, AD-55979.1, AD-55980.1, AD-55981.1, AD-55982.1, AD-55983.1, AD-55984.1, AD-55987.1, AD-55988.1, AD-55989.1, AD-55990.1, AD-55991.1, AD-55994.1, AD-55995.1, AD-55996.1, AD-55999.1, AD-56000.1, AD-56001.1, AD-56002.1, AD-56003.1, AD-56006.1, AD-56007.1, AD-56008.1, AD-56009.1, AD-56011.1, AD-56012.1, AD-56013.1, AD-56016.1, AD-56017.1, AD-56019.1, AD-56020.1, AD-56021.1, AD-56022.1, AD-56024.1, AD-56026.1, AD-56027.1, AD-56029.1, AD-56030.1, AD-56031.1, AD-56032.1, AD-56035.1, AD-56039.1, AD-56041.1, AD-56043.1, AD-56044.1, AD-56047.1, AD-56048.1, AD-56051.1, AD-56053.1, AD-56054.1, AD-56059.1, AD-56062.1, AD-56065.1, AD-56066.1, AD-60770.1, AD-60771.1, AD-60776.1, AD-60777.1, AD-60778.1, AD-60779.1, AD-60780.1, AD-60781.1, AD-60783.1, AD-60784.1, AD-60785.1, AD-60788.1, AD-60789.1, AD-60791.1, AD-60793.1, AD-60795.1, AD-60798.1, AD-60801.1, AD-67903.1, AD-67906.1, AD-67923.1, AD-67924.1, AD-67925.1, AD-67926.1, AD-67935.1, AD-67965.1, AD-67994.1, AD-67995.1, AD-67996.1, AD-68017.1, AD-68022.1, AD-68035.1, AD-68036.1, AD-68037.1, AD-68084.2, AD-68085.2, AD-68086.2, AD-68087.2, AD-68090.2, AD-68091.2, AD-68092.2, AD-68093.2, AD-68116.1, AD-68117.1, AD-68118.1, AD-68124.1, AD-68125.1 или AD-68126.1. В определенных вариантах осуществления смысловая цепь и антисмысловая цепь содержит область комплементарности, которая содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов из области комплементарности какого-либо одного из дуплексов AD-52433.1, AD-52438.1, AD-52439.1, AD-52445.1, AD-52449.1, AD-52451.1, AD-52456.1, AD-52457.1, AD-52462.1, AD-52463.1, AD-52469.1, AD-52474.1, AD-55976.1, AD-55978.1, AD-55979.1, AD-55980.1, AD-55981.1, AD-55982.1, AD-55983.1, AD-55984.1, AD-55987.1, AD-55988.1, AD-55989.1, AD-55990.1, AD-55991.1, AD-55994.1, AD-55995.1, AD-55996.1, AD-55999.1, AD-56000.1, AD-56001.1, AD-56002.1, AD-56003.1, AD-56006.1, AD-56007.1, AD-56008.1, AD-56009.1, AD-56011.1, AD-56012.1, AD-56013.1, AD-56016.1, AD-56017.1, AD-

56019.1, AD-56020.1, AD-56021.1, AD-56022.1, AD-56024.1, AD-56026.1, AD-56027.1, AD-56029.1, AD-56030.1, AD-56031.1, AD-56032.1, AD-56035.1, AD-56039.1, AD-56041.1, AD-56043.1, AD-56044.1, AD-56047.1, AD-56048.1, AD-56051.1, AD-56053.1, AD-56054.1, AD-56059.1, AD-56062.1, AD-56065.1, AD-56066.1, AD-60770.1, AD-60771.1, AD-60776.1, AD-60777.1, AD-60778.1, AD-60779.1, AD-60780.1, AD-60781.1, AD-60783.1, AD-60784.1, AD-60785.1, AD-60788.1, AD-60789.1, AD-60791.1, AD-60793.1, AD-60795.1, AD-60798.1, AD-60801.1, AD-67903.1, AD-67906.1, AD-67923.1, AD-67924.1, AD-67925.1, AD-67926.1, AD-67935.1, AD-67965.1, AD-67994.1, AD-67995.1, AD-67996.1, AD-68017.1, AD-68022.1, AD-68035.1, AD-68036.1, AD-68037.1, AD-68084.2, AD-68085.2, AD-68086.2, AD-68087.2, AD-68090.2, AD-68091.2, AD-68092.2, AD-68093.2, AD-68116.1, AD-68117.1, AD-68118.1, AD-68124.1, AD-68125.1 или AD-68126.1.

В одном из вариантов осуществления антисмысловая цепь содержит область комплементарности, которая содержит по меньшей мере 15 непрерывных немодифицированных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 3 нуклеотида от антисмысловой нуклеотидной последовательности AD-67327 (5'-AUUAGAAGAAAAGGUGGGAGACU-3'; SEQ ID № 537). В другом варианте осуществления область комплементарности состоит из антисмысловой немодифицированной нуклеотидной последовательности AD-67327 (5'-AUUAGAAGAAAAGGUGGGAGACU-3'; SEQ ID № 537). В одном из вариантов осуществления дцРНК содержит смысловую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности 5'-UCUCCCACCUUUUCUUCUAAU-3' (SEQ ID № 499), и антисмысловую цепь, которая состоит из нуклеотидной последовательности 5'-UUAGAAGAAAAGGUGGGAGACU-3' (SEQ ID № 537). В одном из вариантов осуществления средство из двухцепочечной РНКи содержит модифицированную нуклеотидную последовательность AD-67327 (5'-uscsucccAfcCfUfUfuucuucuaau-3'; SEQ ID № 1037 и 5'-asUfsuagAfaaaaaagGfuGfggagascsu-3'; SEQ ID № 1038).

В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид (нуклеотиды) независимо выбирают из группы, состоящей из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-

модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего 5'-фосфориоатную группу, и концевого нуклеотида, связанного с холестерилловым производным или группой бисдециламида додекановой кислоты. В дополнительных вариантах осуществления модифицированный нуклеотид выбирают из группы, состоящей из 2'-дезокси-2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, блокированного нуклеотида, разблокированного нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилнуклеотида, абазического нуклеотида, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидроксил-модифицированного нуклеотида, морфолинонуклеотида, фосфорамидата и нуклеотида, содержащего неприродное основание.

В другом варианте осуществления средства из двухцепочечной РНКи, по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере из 1 нуклеотида. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает РНКи средства, например, средства из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи), способные ингибировать экспрессию ангиотензиногена (AGT) в клетке, где средство из двухцепочечной РНКи содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит область, комплементарную части мРНК, кодирующей AGT, где каждая цепь составляет приблизительно от 14 приблизительно до 30 нуклеотидов в длину, где средство из двухцепочечной РНКи представлено формулой (III):

смысловая: $5' n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q 3'$

антисмысловая: $3' n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-$

$N_a'-n_q' 5'$ (III)

где:

каждое из i , j , k и l независимо представляет собой 0 или

1;

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

каждое N_a и N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными или их сочетаниями, каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

каждое N_b и N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-10 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными или их сочетаниями;

каждое из n_p , $n_{p'}$, n_q и $n_{q'}$, каждое из которых может присутствовать или может не присутствовать, независимо представляет выступающий нуклеотид;

каждое из XXX , YYY , ZZZ , $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ и $Z'Z'Z'$ независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах;

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

где смысловую цепь конъюгируют по меньшей мере с одним лигандом.

В одном из вариантов осуществления i равно 0; j равно 0; i равно 1; j равно 1; как i , так и j равно 0; или как i , так и j равно 1. В другом варианте осуществления k равно 0; l равно 0; k равно 1; l равно 1; как k , так и l равно 0; или как k , так и l равно 1.

В одном из вариантов осуществления XXX комплементарно $X'X'X'$, YYY комплементарно $Y'Y'Y'$ и ZZZ комплементарно $Z'Z'Z'$.

В одном из вариантов осуществления мотив YYY встречается в или около сайта расщепления смысловой цепи.

В другом варианте осуществления мотив $Y'Y'Y'$ встречается в положениях 11, 12 и 13 антисмысловой цепи от 5'-конца.

В одном из вариантов осуществления Y' представляет собой 2'-O-метил.

В одном из вариантов осуществления формула (III)

представлена формулой (IIIa):

смысловая: $5' n_p-N_a-YYY-N_a-n_q 3'$

антисмысловая: $3' n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q' 5'$ (IIIa).

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

смысловая: $5' n_p-N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3'$

антисмысловая: $3' n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a'-n_q' 5'$ (IIIb)

где каждое N_b и N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 1-5 модифицированных нуклеотидов.

В еще одном другом варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIc):

смысловая: $5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_a-n_q 3'$

антисмысловая: $3' n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q' 5'$ (IIIc)

где каждое N_b и N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 1-5 модифицированных нуклеотидов.

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

смысловая: $5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3'$

антисмысловая: $3' n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a'-n_q' 5'$ (IIIId)

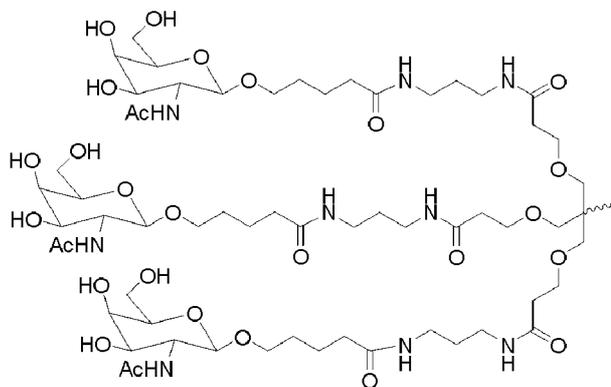
где каждое N_b и N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 1-5 модифицированных нуклеотидов и каждое N_a и N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В одном из вариантов осуществления двухцепочечная область составляет 15-30 нуклеотидных пар в длину. В другом варианте осуществления двухцепочечная область составляет 17-23 нуклеотидных пар в длину. В еще одном другом варианте осуществления, двухцепочечная область составляет 17-25 нуклеотидных пар в длину. В дополнительном варианте осуществления двухцепочечная область составляет 23-27

нуклеотидных пар в длину. В другом варианте осуществления двухцепочечная область составляет 19-21 нуклеотидную пару в длину. В другом варианте осуществления двухцепочечная область составляет 19-23 нуклеотидных пар в длину. В другом варианте осуществления двухцепочечная область составляет 21-23 нуклеотидных пары в длину. В еще одном другом варианте осуществления, каждая цепь имеет 15-30 нуклеотидов. В еще одном другом варианте осуществления, каждая цепь имеет 19-30 нуклеотидов.

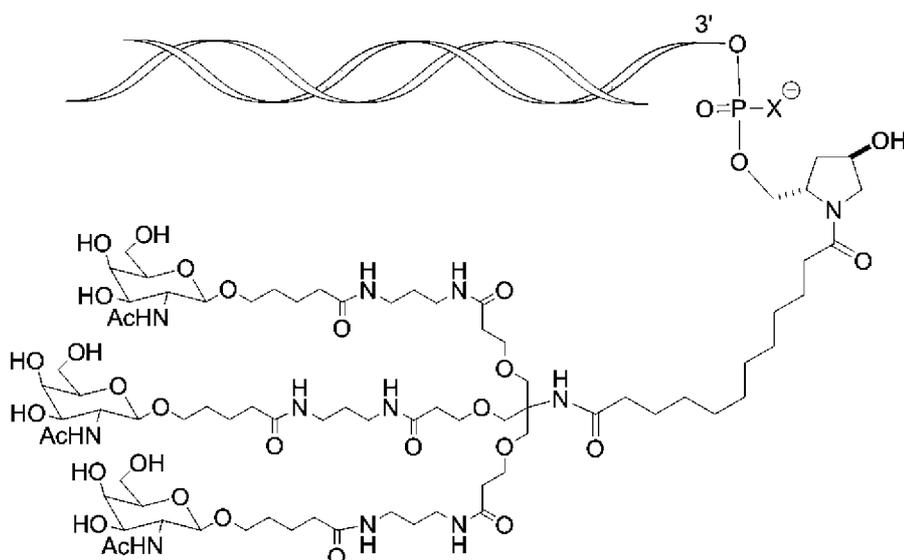
В одном из вариантов осуществления модификации в нуклеотидах выбирают из группы, состоящей из LNA, UNA, CRN, cEt, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-O-алкила, 2'-O-аллила, 2'-C-аллила, 2'-фтора, 2'-дезоксиде, 2'-гидроксила и их сочетаний. В другом варианте осуществления модификации в нуклеотидах представляют собой модификации 2'-O-метил или 2'-фтор.

В одном из вариантов осуществления лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, прикрепленных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер. В другом варианте осуществления лиганд представляет собой



В одном из вариантов осуществления лиганд прикрепляют к 3'-концу смысловой цепи.

В другом варианте осуществления РНКи средство конъюгируют с лигандом, как показано на следующей схеме



в которой X представляет собой O или S. В конкретном варианте осуществления X представляет собой O.

В одном из вариантов осуществления средство дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфориоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

В дополнительном варианте осуществления фосфориоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной цепи. В другом варианте осуществления цепь представляет собой антисмысловую цепь. В другом варианте осуществления цепь представляет собой смысловую цепь.

В одном из вариантов осуществления фосфориоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи. В другом варианте осуществления цепь представляет собой антисмысловую цепь. В дополнительном варианте осуществления цепь представляет собой смысловую цепь.

В одном из вариантов осуществления фосфориоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-, так и на 3'-конце одной цепи. В другом варианте осуществления цепь представляет собой антисмысловую цепь.

В другом варианте осуществления средство из двухцепочечной РНК содержит 6-8 фосфориоатных межнуклеотидных связей. В дополнительном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит две фосфориоатных межнуклеотидных связи на 5'-конце и две фосфориоатных межнуклеотидных связи на 3'-конце, и смысловая

цепь содержит по меньшей мере две фосфориоатных межнуклеотидных связи на 5'-конце или 3'-конце смысловой цепи.

В одном из вариантов осуществления пара оснований в 1 положении 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса представляет собой пару оснований AU. В другом варианте осуществления Y нуклеотиды содержат модификацию 2'-фтор. В дополнительном варианте осуществления Y' нуклеотиды содержат модификацию 2'-O-метил.

В одном из вариантов осуществления $p' > 0$. В другом варианте осуществления $p' = 2$. В дополнительном варианте осуществления $q' = 0$, $p = 0$, $q = 0$ и p' выступающих нуклеотидов комплементарны целевой мРНК. В еще одном дополнительном варианте осуществления $q' = 0$, $p = 0$, $q = 0$ и p' выступающих нуклеотидов некомплементарны целевой мРНК.

В одном из вариантов осуществления смысловая цепь имеет всего 21 нуклеотид и антисмысловая цепь имеет всего 23 нуклеотида.

В другом варианте осуществления по меньшей мере одно p_r' связано с соседним нуклеотидом через фосфориоатную связь. В дополнительном варианте осуществления все p_r' связаны с соседними нуклеотидами через фосфориоатные связи.

В другом варианте осуществления РНКи средство выбирают из группы РНКи средств, перечисленных в любой одной из таблиц 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15.

В одном из аспектов, настоящее изобретение предусматривает средства из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) для ингибирования экспрессии ангиотензиногена (AGT). Средства из двухцепочечной РНКи включают смысловую цепь и антисмысловую цепь, формирующие двухцепочечную область, в которой смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID № 1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID № 2, где по существу все нуклеотиды смысловой цепи содержат

модификацию, выбранную из группы, состоящей из модификации 2'-О-метил и модификации 2'-фтор, где смысловая цепь содержит две фосфориоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце, где по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из модификации 2'-О-метил и модификации 2'-фтор, где антисмысловая цепь содержит две фосфориоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфориоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце и где смысловую цепь конъюгируют с одним или несколькими производными GalNAc, прикрепленными через разветвленный двухвалентный или трехвалентный линкер на 3'-конце.

В одном из вариантов осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает РНКи средства, например, средства из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи), способные к ингибированию экспрессии АГТ (ангиотензиногена) в клетке, где средство из двухцепочечной РНКи содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит область, комплементарную части мРНК, кодирующей АГТ, где каждая цепь составляет приблизительно от 14 приблизительно до 30 нуклеотидов в длину, где средство из двухцепочечной РНКи представлено формулой (III):

смысловая: $5' n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q 3'$

антисмысловая: $3' n_{p'}-N_{a'}-(X'X'X')_k-N_{b'}-Y'Y'Y'-N_{b'}-(Z'Z'Z')_l-$

$N_{a'}-n_{q'} 5'$ (III)

где:

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

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

каждое N_a и $N_{a'}$ независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными или их сочетаниями, каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

каждое N_b и N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-10 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными или их сочетаниями;

каждое n_p , n_p' , n_q и n_q' , каждое из которых может присутствовать или может не присутствовать, независимо представляет выступающий нуклеотид;

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

модификации в N_b отличаются от модификаций в Y и модификации в N_b' отличаются от модификаций в Y'; и

где смысловую цепь конъюгируют по меньшей мере с одним лигандом.

В еще одном аспекте настоящее изобретение предусматривает РНКи средства, например, средства из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи), способные к ингибированию экспрессии ангиотензиногена (AGT) в клетке, где средство из двухцепочечной РНКи содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит область, комплементарную части мРНК, кодирующей AGT, где каждая цепь составляет приблизительно от 14 приблизительно до 30 нуклеотидов в длину, где средство из двухцепочечной РНКи представлено формулой (III):

смысловая: $5' n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q 3'$

антисмысловая: $3' n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-$

$N_a'-n_q' 5'$ (III)

где:

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

каждое n_p , n_q , и n_q' , каждое из которых может присутствовать или может не присутствовать, независимо представляет выступающий нуклеотид;

p , q и q' каждое независимо равно 0-6;

$n_p' > 0$ и по меньшей мере одно n_p' связано с соседним нуклеотидом через фосфориотатную связь;

каждый N_a и N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными или их сочетаниями, каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

каждое N_b и N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-10 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными или их сочетаниями;

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

модификации в N_b отличаются от модификаций в Y и модификации в N_b' отличаются от модификаций в Y'; и

где смысловую цепь конъюгируют по меньшей мере с одним лигандом.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает РНКи средства, например, средства из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи), способные к ингибированию экспрессии ангиотензиногена (AGT) в клетке, где средство из двухцепочечной РНКи содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит область, комплементарную части мРНК, кодирующей AGT, где каждая цепь составляет приблизительно от 14 приблизительно до 30 нуклеотидов в длину, где средство из двухцепочечной РНКи представлено формулой (III):

смысловая: $5' n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q 3'$

антисмысловая: $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l -$

$N_a' - n_q' 5'$ (III)

где:

каждое из i , j , k и l независимо представляет собой 0 или

1;

каждое n_p , n_q и $n_{q'}$, каждое из которых может присутствовать или может не присутствовать, независимо представляет выступающий нуклеотид;

p , q и q' каждое независимо равно 0-6;

$n_{p'} > 0$ и по меньшей мере одно $n_{p'}$ связано с соседним нуклеотидом через фосфориоатную связь;

каждое N_a и N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными или их сочетаниями, каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

каждое N_b и N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-10 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными или их сочетаниями;

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

модификации в N_b отличаются от модификаций в Y и модификации в N_b' отличаются от модификаций в Y'; и

где смысловую цепь конъюгируют по меньшей мере с одним лигандом, где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, прикрепленных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает РНКи средства, например, средства из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи), способные к ингибированию экспрессии ангиотензиногена (AGT) в клетке, где средство из двухцепочечной РНКи содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит область, комплементарную части мРНК, кодирующей AGT, где каждая цепь составляет приблизительно от 14 приблизительно до 30 нуклеотидов в длину, где средство из двухцепочечной РНКи представлено формулой (III):

смысловая: 5' n_p - N_a -(XXX)_i- N_b -YYY- N_b' -(ZZZ)_j- N_a - n_q 3'

антисмысловая: $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$ (III)

где:

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

каждое n_p, n_q и n_q' , каждое из которых может присутствовать или может не присутствовать, независимо представляет выступающий нуклеотид;

p, q и q' каждое независимо равно 0-6;

$n_p' > 0$ и по меньшей мере одно n_p' связано с соседним нуклеотидом через фосфориоатную связь;

каждое N_a и N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными или их сочетаниями, каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

каждое N_b и N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-10 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными или их сочетаниями;

каждое из $XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y'$ и $Z'Z'Z'$ независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах и где модификации представляют собой модификации 2'-O-метил или 2'-фтор;

модификации в N_b отличаются от модификаций в Y и модификации в N_b' отличаются от модификаций в Y' ;

где смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфориоатную связь; и

где смысловую цепь конъюгируют по меньшей мере с одним лигандом, где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, прикрепленных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В еще одном аспекте настоящее изобретение предусматривает РНКи средства, например, средства из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи), способные к ингибированию

экспрессии ангиотензиногена (AGT) в клетке, где средство из двухцепочечной РНКи содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит область, комплементарную части мРНК, кодирующей AGT, где каждая цепь составляет приблизительно от 14 приблизительно до 30 нуклеотидов в длину, где средство из двухцепочечной РНКи представлено формулой (III):

смысловая: 5' n_p - N_a - $Y Y Y$ - N_a - n_q 3'

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

где:

каждое n_p , n_q и n_q' , каждое из которых может присутствовать или может не присутствовать, независимо представляет выступающий нуклеотид;

p , q и q' каждое независимо равно 0-6;

$n_p' > 0$ и по меньшей мере одно n_p' связано с соседним нуклеотидом через фосфориоатную связь;

каждое N_a и N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными или их сочетаниями, каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

$Y Y Y$ и $Y'Y'Y'$ каждое независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах и где модификации представляют собой модификации 2'-O-метил или 2'-фтор;

где смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфориоатную связь; и

где смысловую цепь конъюгируют по меньшей мере с одним лигандом, где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, прикрепленных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает средство из двухцепочечной РНКи, в том числе РНКи средства, перечисленные в любой одной из таблиц 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает

композицию, которая содержит средство из модифицированного антисмыслового полинуклеотида, где средство способно к ингибированию экспрессии ангиотензиногена (AGT) в клетке и содержит последовательность, комплементарную смысловой последовательности, выбранной из группы последовательностей, перечисленных в таблицах 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15, где полинуклеотид составляет приблизительно от 14 приблизительно до 30 нуклеотидов в длину.

Настоящее изобретение также относится к клеткам, векторам, клеткам-хозяевам и фармацевтическим композициям, которые содержат средства из двухцепочечной РНКи по изобретению.

В одном из вариантов осуществления клетка содержит средство из двухцепочечной РНКи.

В некоторых вариантах осуществления средство из двухцепочечной РНКи или композицию, которая содержит средство из модифицированного антисмыслового полинуклеотида, вводят с использованием фармацевтической композиции.

В одном из вариантов осуществления фармацевтические композиции по изобретению содержат липидный состав, такой как ХТС или МСЗ.

В предпочтительных вариантах осуществления средство из двухцепочечной РНКи вводят в растворе. В некоторых вариантах осуществления средство из двухцепочечной РНКи вводят в небуферном растворе. В другом варианте осуществления небуферный раствор представляет собой физиологический раствор или воду. В другом варианте осуществления средство из двухцепочечной РНКи вводят с буферным раствором. В еще одном другом варианте осуществления буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или какое-либо их сочетание. В определенном варианте осуществления буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буфер (PBS).

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способы ингибирования экспрессии ангиотензиногена (AGT) в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством из двухцепочечной РНКи, фармацевтической композицией, композицией, содержащей средство из модифицированного

антисмыслового полинуклеотида, или вектором, содержащим РНКи средство, и поддержание полученной клетки в течение периода времени, достаточного для достижения дегградации мРНК транскрипта гена AGT, тем самым ингибируя экспрессию гена AGT в клетке.

В одном из вариантов осуществления клетка находится внутри субъекта. В дополнительном варианте осуществления субъект является человеком. В дополнительном варианте осуществления субъект страдает от заболевания, ассоциированного с ангиотензиногеном.

В одном из вариантов осуществления экспрессию AGT ингибируют по меньшей мере на приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или приблизительно 100%.

В одном из вариантов осуществления смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 3 нуклеотида от нуклеотидов 2801-2101; 803-843; 834-859; 803-859; 803-875; 834-875; 847-875; 1247-1271; 1566-1624; 1570-1624; 1584-1624; 1584-1624; 1584-1621; 2035-2144; 2070-2144; 2070-2103; 2201-2223; 2227-2360; 2227-2304; 2290-2318; 2304-2350; 2304-2326; 2320-2342; 2333-2360; 2333-2358; 485-503; 517-535; 560-578; 635-653; 803-821; 814-832; 822-840; 825-843; 834-852; 837-855; 841-859; 855-873; 967-985; 1247-1265; 1248-1266; 1249-1267; 1251-1269; 1253-1271; 1566-1584; 1570-1588; 1572-1590; 1574-1592; 1584-1602; 1587-1605; 1591-1609; 1592-1610; 1595-1613; 1601-1619; 1602-1620; 1605-1623; 1729-1747; 1738-1756; 1739-1757; 1741-1769; 1767-1785; 1810-1828; 1827-1845; 1880-1989; 1892-1914; 1894-1914; 1894-2012; 2035-2053; 2046-2064; 2057-2075; 2070-2088; 2072-2090; 2078-2096; 2078-2107; 2078-2011; 2080-2098; 2081-2099; 2081-2104; 2081-2011; 2082-2100; 2084-2102; 2084-2011; 2090-2108; 2100-2118; 2111-2129; 2124-2142; 2125-2143; 2167-2185; 2179-2197; 2201-2219; 2202-2220; 2203-2221; 2204-2222; 2227-2245; 2230-2248; 2234-2252; 2244-2264; 2255-2273; 2266-2284; 2268-2286; 2270-2288; 2279-2297; 2281-2299; 2283-2301; 2284-2302; 2285-2303; 2286-2304; 2288-2306; 2290-2308; 2291-2309; 2291-2311; 2291-2318;

2291-2315; 2292-2310; 2294-2312; 2296-2314; 2299-2317; 2304-2322; 2304-2329; 2306-2324; 2307-2325; 2309-2327; 2309-2329; 2309-2342; 2309-2350; 2309-2358; 2314-2332; 2316-2334; 2317-2335; 2320-2338; 2321-2339; 2323-2341; 2325-2343; 2326-2344; 2328-2346; 2329-2347; 2331-2349; 2333-2351; 2334-2352; 2335-2353; 2339-2357; 2340-2358; или 2341-2359 нуклеотидной последовательности SEQ ID № 1.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способы лечения субъекта, который имеет ассоциированное с ангиотензиногеном (AGT) нарушение, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества средства из двухцепочечной РНКи, композиции, которая содержит средство из модифицированного антисмыслового полинуклеотида, или фармацевтической композиции, которая содержит средство из двухцепочечной РНКи, тем самым осуществляя лечение субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способы лечения субъекта, имеющего ассоциированное с ангиотензиногеном (AGT) нарушение, которые включают подкожное введение субъекту терапевтически эффективного количества двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (РНКи средства), где средство из двухцепочечной РНКи содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, формирующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID № 1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID № 2, где по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из модификации 2'-О-метил и модификации 2'-фтор, где антисмысловая цепь содержит две фосфориоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфориоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, где по существу все нуклеотиды смысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из модификации 2'-О-метил и модификации 2'-фтор, где смысловая цепь содержит две

фосфориоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и где смысловую цепь конъюгируют с одним или несколькими производными GalNAc, прикрепленными через разветвленный двухвалентный или трехвалентный линкер на 3'-конце.

В одном из вариантов осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способы лечения субъекта, имеющего ассоциированное с ангиотензиногеном (AGT) нарушение, которые включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (РНКи средства), где средство из двухцепочечной РНКи содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, формирующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 3 нуклеотида от нуклеотидов 2801-2101; 803-843; 834-859; 803-859; 803-875; 834-875; 847-875; 1247-1271; 1566-1624; 1570-1624; 1584-1624; 1584-1624; 1584-1621; 2035-2144; 2070-2144; 2070-2103; 2201-2223; 2227-2360; 2227-2304; 2290-2318; 2304-2350; 2304-2326; 2320-2342; 2333-2360; 2333-2358; 485-503; 517-535; 560-578; 635-653; 803-821; 814-832; 822-840; 825-843; 834-852; 837-855; 841-859; 855-873; 967-985; 1247-1265; 1248-1266; 1249-1267; 1251-1269; 1253-1271; 1566-1584; 1570-1588; 1572-1590; 1574-1592; 1584-1602; 1587-1605; 1591-1609; 1592-1610; 1595-1613; 1601-1619; 1602-1620; 1605-1623; 1729-1747; 1738-1756; 1739-1757; 1741-1769; 1767-1785; 1810-1828; 1827-1845; 1880-1989; 1892-1914; 1894-1914; 1894-2012; 2035-2053; 2046-2064; 2057-2075; 2070-2088; 2072-2090; 2078-2096; 2078-2107; 2078-2011; 2080-2098; 2081-2099; 2081-2104; 2081-2011; 2082-2100; 2084-2102; 2084-2011; 2090-2108; 2100-2118; 2111-2129; 2124-2142; 2125-2143; 2167-2185; 2179-2197; 2201-2219; 2202-2220; 2203-2221; 2204-2222; 2227-2245; 2230-2248; 2234-2252; 2244-2264; 2255-2273; 2266-2284; 2268-2286; 2270-2288; 2279-2297; 2281-2299; 2283-2301; 2284-2302; 2285-2303; 2286-2304; 2288-2306; 2290-2308; 2291-2309; 2291-2311; 2291-2318; 2291-2315; 2292-2310; 2294-2312;

2296-2314; 2299-2317; 2304-2322; 2304-2329; 2306-2324; 2307-2325; 2309-2327; 2309-2329; 2309-2342; 2309-2350; 2309-2358; 2314-2332; 2316-2334; 2317-2335; 2320-2338; 2321-2339; 2323-2341; 2325-2343; 2326-2344; 2328-2346; 2329-2347; 2331-2349; 2333-2351; 2334-2352; 2335-2353; 2339-2357; 2340-2358; или 2341-2359 нуклеотидной последовательности SEQ ID № 1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 3 нуклеотида от нуклеотидов в соответствующем положении нуклеотидной последовательности SEQ ID № 2, так что антисмысловая цепь по существу комплементарна по меньшей мере 15 непрерывным нуклеотидам в смысловой цепи. В определенных вариантах осуществления по существу все нуклеотиды смысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды. В других вариантах осуществления по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды. В других вариантах осуществления по существу все нуклеотиды обеих цепей представляют собой модифицированные нуклеотиды. В одном из вариантов осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды. В одном из вариантов осуществления смысловую цепь конъюгируют с лигандом, прикрепленным к 3'-концу.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способы лечения субъекта, имеющего ассоциированное с ангиотензиногеном (AGT) нарушение, которые включают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (РНКи средства), где средство из двухцепочечной РНКи содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, формирующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов из нуклеотидов 803-843; 834-859; 803-859; 1247-1271; 1566-1624; 1570-1624; 1584-1624; 1584-1624; 1584-1621; 2035-2144; 2070-2144; 2070-2103; 2201-2223; 2227-2360; 2227-2304; 2290-2318; 2304-2350; 2304-2326; 2320-2342; 2333-2360; 2333-2358; 485-503; 517-535; 560-578; 635-653; 803-821; 814-832; 822-840; 825-843;

834-852; 837-855; 841-859; 855-873; 967-985; 1247-1265; 1248-1266; 1249-1267; 1251-1269; 1253-1271; 1566-1584; 1570-1588; 1572-1590; 1574-1592; 1584-1602; 1587-1605; 1591-1609; 1592-1610; 1595-1613; 1601-1619; 1602-1620; 1605-1623; 1729-1747; 1738-1756; 1739-1757; 1741-1769; 1767-1785; 1810-1828; 1827-1845; 1880-1989; 1894-2012; 2035-2053; 2046-2064; 2057-2075; 2070-2088; 2072-2090; 2078-2096; 2080-2098; 2081-2099; 2082-2100; 2084-2102; 2090-2108; 2100-2118; 2111-2129; 2124-2142; 2125-2143; 2167-2185; 2179-2197; 2201-2219; 2202-2220; 2203-2221; 2204-2222; 2227-2245; 2230-2248; 2234-2252; 2244-2264; 2255-2273; 2266-2284; 2268-2286; 2270-2288; 2279-2297; 2281-2299; 2283-2301; 2284-2302; 2285-2303; 2286-2304; 2288-2306; 2290-2308; 2291-2309; 2292-2310; 2294-2312; 2296-2314; 2299-2317; 2304-2322; 2306-2324; 2307-2325; 2309-2327; 2314-2332; 2316-2334; 2317-2335; 2320-2338; 2321-2339; 2323-2341; 2325-2343; 2326-2344; 2328-2346; 2329-2347; 2331-2349; 2333-2351; 2334-2352; 2335-2353; 2339-2357; 2340-2358; или 2341-2359 нуклеотидной последовательности SEQ ID № 1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 непрерывных нуклеотидов из нуклеотидов в соответствующем положении нуклеотидной последовательности SEQ ID № 2, так что антисмысловая цепь по существу комплементарна по меньшей мере 15 непрерывным нуклеотидам в смысловой цепи. В определенных вариантах осуществления по существу все нуклеотиды смысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды. В других вариантах осуществления по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды. В других вариантах осуществления по существу все нуклеотиды обеих цепей представляют собой модифицированные нуклеотиды. В одном из вариантов осуществления смысловую цепь конъюгируют с лигандом, прикрепленным к 3'-концу.

В одном из вариантов осуществления субъектом является человек.

В одном из вариантов осуществления заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, выбирают из группы,

состоящей из гипертензии, пограничной гипертензии, первичной гипертензии, вторичной гипертензии, гипертонического криза, экстренного гипертензивного состояния, изолированной систолической или диастолической гипертензии, гипертензии, ассоциированной с беременностью, диабетической гипертензии, резистентной гипертензии, рефракторной гипертензии, пароксизмальной гипертензии, реноваскулярной гипертензии, гипертензии Голдблатта, глазной гипертензии, глаукомы, легочной гипертензии, портальной гипертензии, системной венозной гипертензии, систолической гипертензии, лабильной гипертензии; гипертензивной кардиопатии, гипертензивной нефропатии, атеросклероза, артериосклероза, васкулопатии, диабетической нефропатии, диабетической ретинопатии, хронической сердечной недостаточности, кардиомиопатии, диабетической кардиомиопатии, гломерулосклероза, коарктации аорты, аневризмы аорты, фиброза желудочков, синдрома Кушинга и других состояний избытка глюкокортикоидов, включая хроническую стероидную терапию, феохромоцитому, рениному, вторичный альдостеронизм и другие состояния избытка минералокортикоидов, апноэ во сне, заболевания щитовидной/паращитовидной железы, сердечную недостаточность, инфаркт миокарда, стенокардию, инсульт, сахарный диабет, заболевание почек, почечную недостаточность, системный склероз, задержку внутриутробного развития (IUGR) и задержку развития плода.

В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, выбирают из группы, состоящей из гипертензии, гипертензивной кардиопатии, гипертензивной нефропатии, гипертензии, ассоциированной с беременностью, атеросклероза, артериосклероза, хронической почечной недостаточности, гломерулосклероза, коарктации аорты, аневризмы аорты, фиброза желудочков, синдрома Кушинга и других состояний избытка глюкокортикоидов, включая хроническую стероидную терапию, феохромоцитому, первичный альдостеронизм и другие состояния избытка минералокортикоидов, апноэ во сне, заболевание щитовидной/паращитовидной железы, сердечную недостаточность, инфаркт миокарда, инсульт, сахарный диабет,

почечную недостаточность и системный склероз.

В одном из вариантов осуществления заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, представляет собой гипертензию, ассоциированную с беременностью (например, гипертензия, вызванная беременностью, предэклампсия и эклампсия) и введение иРНК по изобретению субъекту ведет к снижению кровяного давления матери; снижению альбуминурии матери; увеличению маточно-плацентарного удельного веса; увеличению массы плода; нормализации соотношения головного мозга и печени плода; снижению экспрессии мРНК AGT в печени матери и без значительного снижения экспрессии мРНК AGT в плаценте; увеличению общего размера плаценты; увеличению размера ворсинчатой плаценты; без значительного изменения в размере трофоспонгия плаценты; снижению соотношения экспрессии мРНК sFLT1:PLGF в почках матери; снижению соотношения уровней sFLT1:PLGF в сыворотке; и/или снижению уровня агонистических аутоантител к AT1.

В одном из вариантов осуществления средство из двухцепочечной РНКи вводят в дозе приблизительно от 0,01 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг или приблизительно от 0,5 мг/кг приблизительно до 50 мг/кг. В предпочтительном варианте осуществления средство из двухцепочечной РНКи вводят в дозе приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг или приблизительно 3,0 мг/кг. В одном из вариантов осуществления средство из двухцепочечной РНКи вводят в дозе приблизительно 10 мг/кг. В одном из вариантов осуществления средство из двухцепочечной РНКи вводят в дозе приблизительно 0,5 мг/кг два раза в неделю. В другом варианте осуществления средство из двухцепочечной РНКи вводят в дозе приблизительно 10 мг/кг через неделю. В другом варианте осуществления средство из двухцепочечной РНКи вводят в дозе приблизительно 0,5-1,0 мг/кг один раз в неделю. В другом варианте осуществления РНКи средство вводят приблизительно один раз в неделю, один раз в месяц, один раз через два месяца или один раз в квартал (т. е., один раз через три месяца) в дозе приблизительно от 0,1 мг/кг приблизительно до 5,0 мг/кг.

В одном из вариантов осуществления средство из двухцепочечной РНКи вводят подкожно или внутривенно.

В одном из вариантов осуществления РНКи средство вводят двумя или более дозами.

В одном из вариантов осуществления РНКи средство вводят через интервалы, выбранные из группы, состоящей из одного раза каждые приблизительно 12 часов, одного раза каждые приблизительно 24 часа, одного раза каждые приблизительно 48 часов, одного раза каждые приблизительно 72 часа и одного раза каждые приблизительно 96 часов.

В одном из вариантов осуществления РНКи средство вводят два раза в неделю.

В одном из вариантов осуществления РНКи средство вводят через неделю.

В определенных вариантах осуществления РНКи средство вводят один раз в месяц.

В определенных вариантах осуществления РНКи средство вводят один раз через месяц.

В определенных вариантах осуществления РНКи средство вводят один раз в квартал (т. е., каждые три месяца).

В еще одном другом варианте осуществления способы дополнительно включают введение дополнительного терапевтического средства субъекту. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство выбирают из группы, состоящей из диуретика, ингибитора ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ), антагониста рецептора ангиотензина II, бета-блокатора, вазодиллятора, блокатора кальциевых каналов, антагониста альдостерона, альфа₂-агониста, ингибитора ренина, альфа-блокатора, адренергического средства периферического действия, избирательного частичного агониста рецептора D₁, неизбирательного альфа-адренергического антагониста, синтетического, стероидного антиминералкортикоидного средства или комбинации каких-либо из приведенных выше и терапевтического средства от гипертензии, сформулированного в виде комбинации средств.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлена схема ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (RAAS), которая содержит обозначение различных точек в системе, которые были мишенями для терапевтического вмешательства (из Zaman, et al. (2002) Nat Rev Drug Disc 1:621).

На фиг. 2А представлен график, показывающий снижение среднего артериального кровяного давления у беременных трансгенных крыс после введения AD-60771.

На фиг. 2В представлен график, показывающий снижение сывороточного альбумина у беременных трансгенных крыс после введения AD-60771.

На фиг. 3А представлен график, показывающий увеличенный маточно-плацентарный удельный вес после введения AD-60771 матери, что демонстрирует улучшение исхода плода после введения AD-60771 матери.

На фиг. 3В представлен график, показывающий повышенную массу плода после введения AD-60771 матери, что демонстрирует улучшение исхода плода после введения AD-60771 матери.

На фиг. 3С представлен график, показывающий нормализованное соотношение головного мозга и печени плода после введения AD-60771 матери, что демонстрирует улучшение исхода плода после введения AD-60771 матери.

На фиг. 4А представлен график, показывающий снижение мРНК hAGT в печени матери после введения AD-60771, что демонстрирует то, что иРНК не проходит через плацентарный барьер.

На фиг. 4В представлен график, показывающий отсутствие значимого снижения мРНК hAGT в плаценте, что демонстрирует то, что иРНК не проходит через плацентарный барьер.

На фиг. 5 представлен график, показывающий воздействие AD-60771 на ткань печени матери, плаценты и печени плода.

На фиг. 6А представлен срез плаценты от беременной крысы дикого типа после иммуногистохимического окрашивания на цитокератин.

На фиг. 6В представлен срез плаценты от не получавшей лечение беременной PE крысы после иммуногистохимического окрашивания на цитокератин.

На фиг. 6С представлен срез плаценты от беременной РЕ крысы, которой вводили AD-60771, после иммуногистохимического окрашивания на цитокератин.

На фиг. 6D представлен график, показывающий размер мезометриального треугольника у беременной РЕ крысы, которой вводили AD-60771, и не получавшей лечение беременной РЕ крысы.

На фиг. 6E представлен график, показывающий размер трофоспонгия у беременной РЕ крысы, которой вводили AD-60771, и не получавшей лечение беременной РЕ крысы.

На фиг. 6F представлен график, показывающий размер плаценты у беременной РЕ крысы, которой вводили AD-60771, и не получавшей лечение беременной РЕ крысы.

На фиг. 6G представлен график, показывающий размер лабиринта у беременных РЕ крыс, которым вводили AD-60771, и не получавших лечение беременной РЕ крысы.

На фиг. 7A представлен график, показывающий снижение количества мРНК антиангиогенного фактора sFLT1 в почке матери после введения AD-60771.

На фиг. 7B представлен график, показывающий снижение количества мРНК ангиогенного фактора PLGF в почке матери после введения AD-60771.

На фиг. 7C представлен график, показывающий снижение количества мРНК антиангиогенного фактора sFLT1 в плаценте после введения AD-60771 матери.

На фиг. 7D представлен график, показывающий снижение количества мРНК ангиогенного фактора PLGF в плаценте после введения AD-60771 матери.

На фиг. 8 представлен график, показывающий снижение уровней AT1-AA у РЕ крыс, которым вводили AD-60771, как оценивали по влиянию AT1-AA, выделенного у контрольных РЕ крыс и беременных РЕ крыс, на частоту самопроизвольного биения кардиомиоцитов неонатальной крысы.

На фиг. 9A представлен график, показывающий снижение уровней ангиотензина II сыворотки (Ang 2-10) у беременных РЕ крыс, которым вводили AD-60771, по сравнению с небеременными РЕ крысами и по сравнению с беременными контрольными крысами

Sprague-Dawley.

На фиг. 9В представлен график, показывающий снижение уровней сывороточного AGT человека (hAGT) и AGT крысы (rAGT) у беременных PE крыс, которым вводили AD-60771, по сравнению с небеременными PE крысами и по сравнению с беременными контрольными крысами Sprague-Dawley.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение предусматривает композиции иРНК, которые вызывают опосредованное РНК-индуцируемым комплексом выключения гена (RISC) расщепление РНК транскриптов гена ангиотензиногена (AGT). Ген может находиться внутри клетки, например, клетки внутри субъекта, такого как человек.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения субъекта, который имеет нарушение, для которого будет полезно ингибирование или снижение экспрессии гена AGT, например, заболевание, ассоциированное с ангиотензином, такое как гипертензия или гипертензия, ассоциированная с беременностью, с использованием композиций иРНК, которые вызывают опосредованное РНК-индуцируемым комплексом выключения гена (RISC) расщепление РНК транскриптов гена AGT.

иРНК по изобретению включают РНК цепь (антисмысловую цепь), которая имеет область, которая составляет приблизительно 30 нуклеотиды или меньше в длину, например, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида в длину, эта область по существу комплементарна по меньшей мере части мРНК транскрипта гена AGT. В определенных вариантах осуществления иРНК по изобретению включают РНК цепь (антисмысловую цепь), которая может быть более длинной, например, вплоть до 66 нуклеотидов, например, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 нуклеотидов в длину, с областью по меньшей мере 19 непрерывных нуклеотидов, которая по существу

комплементарна по меньшей мере части мРНК транскрипта гена AGT. Эти иРНК с более длинными антисмысловыми цепями включают вторую РНК цепь (смысловая цепь) 20–60 нуклеотидов в длину, в которой смысловая и антисмысловая цепи формируют дуплекс из 18–30 непрерывных нуклеотидов. Использование этих иРНК делает возможной направленную деградацию мРНК соответствующего гена (гена AGT) у млекопитающих. Очень низкие дозы иРНК по изобретению, в частности, могут специфично и эффективно опосредовать РНК-интерференцию (РНКи), что ведет к значительному ингибированию экспрессии соответствующего гена (гена AGT). Используя анализы *in vitro* и *in vivo*, авторы настоящего изобретения демонстрировали, что иРНК, направленные на ген ангиотензиногена, могут опосредовать РНКи, что ведет к значительному ингибированию экспрессии AGT, а также снижению симптомов, связанных с заболеванием, ассоциированным с ангиотензиногеном, таким как гипертензия, ассоциированная с беременностью (например, гипертензия, вызванная беременностью, предэклампсия и эклампсия). Таким образом, способы и композиции, включающие эти иРНК, можно использовать для лечения субъекта, который имеет заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, такое как гипертензия.

Следующее подробное описание раскрывает, как получать и использовать композиции, содержащие иРНК, чтобы ингибировать экспрессию гена ангиотензиногена, а также композиции, использование и способы лечения субъектов, имеющих заболевания и нарушения, для которых будет полезно ингибирование и/или снижение экспрессии AGT.

I. Определения

Для того, чтобы настоящее изобретение можно было легче понять сначала определены некоторые термины. Кроме того, следует отметить, что, несмотря на то, что изложено значение или диапазон значений параметра, подразумевают, что значения и диапазоны, расположенные между изложенными значениями, также предусмотрены в качестве части данного изобретения.

Формы единственного числа используют в настоящем документе для обозначения одного или больше чем одного (т. е., по меньшей

мере одного) грамматического объекта в разделе. В качестве примера, «элемент» обозначает один элемент или больше чем один элемент, например, множество элементов.

Термин «включая» используют в настоящем документе для обозначения и взаимозаменяемого использования с фразой «включая в качестве неограничивающих примеров».

Термин «или» используют в настоящем документе для обозначения и взаимозаменяемого использования с термином «и/или» до тех пор, пока контекст не диктует явно иное.

Термин «приблизительно» используют в настоящем документе для обозначения типичных диапазонов допусков в данной области. Как используют в настоящем документе, «ангиотензиноген», используемый взаимозаменяемо с термином «AGT», относится к общеизвестному гену и полипептиду, также известному в данной области как ингибитор пептидазы серпин, клада А, элемент 8; альфа-1 антипротеиназа; антитрипсин; СЕРПИНА8; ангиотензин I; серпин А8; ангиотензин II; альфа-1 антипротеиназа ангиотензиноген; антитрипсин; преангиотензиноген 2; ANHU; ингибитор сериновой протеиназы; и ингибитор цистеиновой протеиназы.

Термин «AGT» включает AGT человека, аминокислотную и полную кодирующую последовательность которого можно найти, например, по номеру доступа GenBank GI:188595658 (NM_000029.3; SEQ ID № 1); AGT *Macaca fascicularis*, аминокислотную и полную кодирующую последовательность которого можно найти, например, по номеру доступа GenBank GI: 90075391 (AB170313.1: SEQ ID № 3); AGT мыши (*Mus musculus*), аминокислотную и полную кодирующую последовательность которого можно найти, например, по номеру доступа GenBank GI: 113461997 (NM_007428.3; SEQ ID № 5); и AGT крысы (*Rattus norvegicus*), аминокислотную и полную кодирующую последовательность которого можно найти, например, по номеру доступа GenBank GI:51036672 (NM_134432; SEQ ID № 7).

Дополнительные примеры мРНК последовательностей AGT легко доступны с использованием общедоступных баз данных, например, GenBank, UniProt, OMIM и веб-сайта проекта генома макаки.

Термин «AGT», как используют в настоящем документе, также

относится к встречающимся в природе вариациям последовательности ДНК гена AGT, таким как однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в гене AGT. Образцовые SNP можно найти в базе данных dbSNP, доступной по адресу www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?geneId=183.

Неограничивающие примеры вариаций последовательностей в гене AGT включают, например, те, которые описаны в патенте США № 5589584, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Например, вариации последовательности в гене AGT могут включать C→T в положении -532 (относительно участка начала транскрипции); G→A в положении -386; G→A в положении -218; C→T в положении -18; G→A и а A→C в положении -6 и -10; C□T в положении +10 (нетранслируемом); C□T в положении +521 (T174M); T□C в положении +597 (P199P); T□C в положении +704 (M235T; также см., например, Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs699, доступно по адресу www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP); A□G в положении +743 (Y248C); C□T в положении +813 (N271N); G□A в положении +1017 (L339L); C□A в положении +1075 (L359M); и/или G□A в положении +1162 (V388M).

Как используют в настоящем документе, «целевая последовательность» относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, сформированной во время транскрипции гена AGT, включая мРНК, которая является продуктом процессинга РНК первичного продукта транскрипции. В одном из вариантов осуществления целевая часть последовательности должна быть по меньшей мере достаточно длинна, чтобы служить в качестве субстрата для иРНК-направленного расщепления в этой части или около этой части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, сформированной во время транскрипции гена AGT.

Целевая последовательность может составлять приблизительно 9-36 нуклеотидов в длину, например, приблизительно 15-30 нуклеотидов в длину. Например, целевая последовательность может составлять приблизительно 15-30 нуклеотидов, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-

23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида в длину. Диапазоны и длины внутри указанных выше диапазонов и длин также предусмотрены в качестве части изобретения.

Как используют в настоящем документе, термин «цепь содержит последовательность» относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которая описана с помощью последовательности, приведенной с использованием стандартной номенклатуры нуклеотидов.

«G», «C», «A», «T» и «U» каждый в целом обозначает нуклеотид, который содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил в качестве основания, соответственно. Однако понятно, что термин «рибонуклеотид» или «нуклеотид» также может относиться к модифицированному нуклеотиду, как дополнительно подробно изложено далее, или суррогатному замещающему фрагменту (см., например, таблицу 2). Специалист хорошо осведомлен, что гуанин, цитозин, аденин и урацил можно заменять на другие фрагменты без изменения свойств образования пар оснований по существу у олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такой замещающий фрагмент. Например, без ограничения, нуклеотид, содержащий инозин, в качестве своего основания, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, включающими аденин, цитозин или урацил. Таким образом, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, можно заменять в нуклеотидных последовательностях дцРНК по изобретению нуклеотидом, содержащим, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любом месте в олигонуклеотиде можно заменять на гуанин и урацил, соответственно для того, чтобы формировать нестрого соответствующую пару оснований G-U с целевой мРНК. Последовательности, содержащие такие замещающие фрагменты, подходят для композиции и способов по изобретению.

Термины «иРНК», «РНКи средство», «иРНК средство», «средство для РНК-интерференции», как взаимозаменяемо используют в настоящем документе, относятся к средству, которое содержит РНК, как этот термин определяют в настоящем документе, и которое

опосредует направленное расщепление РНК транскрипта через путь РНК-индуцируемого комплекса выключения гена (RISC). иРНК управляет специфичной деградацией последовательности мРНК через процесс, известный как РНК-интерференция (РНКи). иРНК модулирует, например, ингибирует, экспрессию АГТ в клетке, например, в клетке внутри субъекта, такого как млекопитающий субъект.

В одном из вариантов осуществления РНКи средство по изобретению включает одноцепочечную РНК, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, с целевой последовательностью мРНК АГТ, чтобы управлять расщеплением целевой РНК. Не желая ограничиваться теорией, полагают, что длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, разрушается до миРНК с помощью эндонуклеазы III типа, известной как дайсер (Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485). Дайсер, фермент, похожий на рибонуклеазу III, процессирует дцРНК до коротких интерферирующих РНК по 19-23 пар оснований с характерными 3'-выступами в два основания (Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363). Затем миРНК встраиваются в РНК-индуцируемый комплекс выключения гена (RISC), где одна или несколько хеликаз разматывают миРНК дуплекс, позволяя комплементарной антисмысловой цепи управлять распознаванием мишени (Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309). После связывания с подходящей целевой мРНК, одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень, чтобы индуцировать выключение гена (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188). Таким образом, в одном из аспектов изобретение относится к одноцепочечной РНК (миРНК), образуемой внутри клетки и способствующей формированию RISC комплекса для того, чтобы вызывать включение целевого гена, т. е. гена АГТ. Соответственно, термин «миРНК» также используют в настоящем документе для обозначения РНКи, как описано выше.

В определенных вариантах осуществления РНКи средство может представлять собой одноцепочечную миРНК (оцРНКи), которую вводят в клетку или организм для того, чтобы ингибировать целевую мРНК. Средства с одноцепочечными РНКи связываются с RISC

эндонуклеазой, Argonaute 2, которая затем расщепляет целевую мРНК. Одноцепочечные миРНК в целом составляют 15-30 нуклеотидов и химически модифицированы. Конструирование и тестирование одноцепочечных миРНК описано в патенте США № 8101348 и у Lima et al., (2012) Cell 150:883-894, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки. Любые из антисмысловых нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе, можно использовать в качестве одноцепочечной миРНК, как описано в настоящем документе, или в качестве химически модифицированных с помощью способов, описанных у Lima et al., (2012) Cell 150:883-894.

В другом варианте осуществления «иРНК» для использования в композициях, использованиях и способах по изобретению представляет собой двухцепочечную РНК, и ее называют в настоящем документе как «средство из двухцепочечной РНКи», «молекула двухцепочечной РНК (дцРНК)», «дцРНК средство», или «дцРНК». Термин «дцРНК» относится к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющих дуплексную структуру, содержащую две антипараллельных и по существу комплементарных цепи нуклеиновых кислот, обозначаемые как имеющие «смысловую» и «антисмысловую» ориентации в отношении целевой РНК, т. е., гена АГТ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, двухцепочечная РНК (дцРНК) запускает деградацию целевой РНК, например, мРНК, через механизм посттранскрипционного выключения гена, обозначаемый в настоящем документе как РНК-интерференция или РНКи.

В целом, большинство нуклеотидов каждой цепи молекулы дцРНК представляет собой рибонуклеотиды, но как подробно описано в настоящем документе, каждая цепь или обе цепи также могут содержать один или несколько не рибонуклеотидов, например, дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, как используют в этом описании, «РНКи средство» может содержать рибонуклеотиды с химическими модификациями; РНКи средство может содержать существенные модификации в множестве нуклеотидов. Как используют в настоящем документе, термин «модифицированный нуклеотид» относится к нуклеотиду, который независимо имеет модифицированный фрагмент сахара,

модифицированную межнуклеотидную связь и/или модифицированное нуклеиновое основание. Таким образом, термин модифицированный нуклеотид охватывает замены, добавления или удаления, например, функциональных групп или атомов, в межнуклеозидных связях, фрагментах сахаров или нуклеиновых основаниях. Модификации, пригодные для использования в средствах по изобретению, включают модификации всех типов, описанных в настоящем документе или известных в данной области. Любые такие модификации, как используют в молекуле типа миРНК, включены в «РНКи средство» для целей этого описания и формулы изобретения.

Большинство нуклеотидов в каждой цепи молекулы дцРНК может представлять собой рибонуклеотиды, но как подробно описано в настоящем документе, каждая цепь или обе цепи также могут включать один или несколько не рибонуклеотидов, например, дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, как используют в этом описании, «РНКи средство» может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; РНКи средство может включать существенные модификации во множестве нуклеотидов. Как используют в настоящем документе, термин «модифицированный нуклеотид» относится к нуклеотиду, который независимо имеет модифицированный фрагмент сахара, модифицированную межнуклеотидную связь и/или модифицированное нуклеиновое основание. Таким образом, термин модифицированный нуклеотид охватывает замены, добавления или удаления, например, функциональных групп или атомов, в межнуклеозидных связях, фрагментах сахаров или нуклеиновых основаниях. Модификации, пригодные для использования в средствах по изобретению, включают модификации всех типов, описанных в настоящем документе или известных в данной области. Любые такие модификации, как используют в молекуле типа миРНК, включены в «РНКи средство» для целей этого описания и формулы изобретения.

Область дуплекса может быть любой длины, которая допускает специфичную деградацию желаемой целевой РНК через путь RISC, и может находиться в диапазоне приблизительно от 9 до 36 пар оснований в длину, например, приблизительно 15–30 пар оснований в длину, например, приблизительно 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,

17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 пар оснований в длину, например, приблизительно 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований в длину. Диапазоны и длины между приведенными выше диапазонами и длинами также предусмотрены в качестве части изобретения.

Две цепи, образующие структуру дуплекса, могут представлять собой различные части одной более крупной молекулы РНК или они могут представлять собой отдельные молекулы РНК. Когда две цепи представляют собой часть одной более крупной молекулы и, следовательно, соединены с помощью непрерывной цепи нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующих структуру дуплекса, соединяющую цепь РНК обозначают как «петля шпильки». Петля шпильки может содержать по меньшей мере один не спаренный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления петля шпильки может содержать по меньшей мере 2, 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 больше не спаренных нуклеотидов.

Когда две по существу комплементарных цепи дцРНК содержатся в отдельных молекулах РНК, эти молекулы не обязательно, но могут быть ковалентно связаны. Когда две цепи соединены ковалентно с помощью средства, отличного от непрерывной цепи нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующих структуру дуплекса, соединяющую структуру обозначают как «линкер». Цепи РНК могут иметь одинаковое или различающееся число нуклеотидов. Максимальное число пар оснований представляет собой число нуклеотидов в самой короткой цепи дцРНК минус какие-либо выступы, которые присутствуют в

дуплексе. В дополнение к структуре дуплекса, РНКи может содержать один или несколько выступающих нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления РНКи средство по изобретению представляет собой дцРНК, каждая цепь которой содержит 19–23 нуклеотида, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, гена AGT. Не желая ограничиваться теорией, длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, разрушается до миРНК с помощью эндонуклеазы III типа, известной как дайсер (Sharp et al. (2001) *Genes Dev.* 15:485). Дайсер, фермент, похожий на рибонуклеазу III, процессирует дцРНК до короткой интерферирующей РНК из 19–23 пар оснований с характерными 3'-выступами в два основания (Bernstein, et al., (2001) *Nature* 409:363). Затем миРНК встраивается в РНК-индуцируемый комплекс выключения гена (RISC), где одна или несколько хеликаз разматывают миРНК дуплекс, позволяя комплементарной антисмысловой цепи управлять распознаванием мишени (Nykanen, et al., (2001) *Cell* 107:309). После связывания с подходящей целевой мРНК, одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень для того, чтобы индуцировать выключение гена (Elbashir, et al., (2001) *Genes Dev.* 15:188).

В одном из вариантов осуществления РНКи средство по изобретению представляет собой дцРНК из 24–30 нуклеотидов, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, целевой последовательностью мРНК AGT, чтобы управлять расщеплением целевой РНК. Не желая ограничиваться теорией, длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, разрушается до миРНК с помощью эндонуклеазы III типа, известной как дайсер (Sharp et al. (2001) *Genes Dev.* 15:485). Дайсер, фермент, похожий на рибонуклеазу III, процессирует дцРНК до короткой интерферирующей РНК из 19–23 пар оснований с характерными 3'-выступами в два основания (Bernstein, et al., (2001) *Nature* 409:363). Затем миРНК встраивается в РНК-индуцируемый комплекс выключения гена (RISC), где одна или несколько хеликаз разматывают миРНК дуплекс, позволяя комплементарной антисмысловой цепи направлять распознавание мишени (Nykanen, et

al., (2001) Cell 107:309). После связывания с подходящей целевой мРНК, одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень для того, чтобы индуцировать выключение гена (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188).

Как используют в настоящем документе, термин «выступающий нуклеотид» относится по меньшей мере к одному не спаренному нуклеотиду, который выступает из структуры дуплекса иРНК, например, дцРНК. Например, когда 3'-конец одной цепи дцРНК выходит за пределы 5'-конца другой цепи, или наоборот, имеет место выступающий нуклеотид. дцРНК может содержать выступ по меньшей мере в один нуклеотид; альтернативно выступ может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или больше. Выступающий нуклеотид может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, в том числе дезоксинуклеотида/нуклеозида. Выступ(выступы) могут находиться на смысловой цепи, антисмысловой цепи или каком-либо их сочетании. Кроме того, нуклеотид(нуклеотиды) выступа могут быть представлены на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах любой из антисмысловой или смысловой цепи дцРНК.

В одном из вариантов осуществления антисмысловая цепь дцРНК имеет на 3'-конце и/или 5'-конце выступ из 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов. В одном из вариантов осуществления смысловая цепь дцРНК имеет на 3'-конце и/или 5'-конце выступ из 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления выступ на смысловой цепи или антисмысловой цепи или на них обеих может включать увеличенные длины, превышающие 10 нуклеотидов, например, 1-30 нуклеотидов, 2-30 нуклеотидов, 10-30 нуклеотидов или 10-15 нуклеотидов в длину. В определенных вариантах осуществления увеличенный выступ находится на смысловой цепи дуплекса. В определенных вариантах осуществления увеличенный выступ присутствует на 3'-конце смысловой цепи дуплекса. В определенных вариантах осуществления увеличенный выступ присутствует на 5'-конце смысловой цепи дуплекса. В

определенных вариантах осуществления увеличенный выступ находится на антисмысловой цепи дуплекса. В определенных вариантах осуществления увеличенный выступ присутствует на 3'-конце антисмысловой цепи дуплекса. В определенных вариантах осуществления увеличенный выступ присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи дуплекса. В определенных вариантах осуществления один или несколько нуклеотидов в выступе заменяют на нуклеозидтиофосфат.

«Тупой» или «тупой конец» обозначает, что отсутствуют не спаренные нуклеотиды на этом конце средства из двухцепочечной РНК, т. е., нет выступающего нуклеотида. РНК средство «с тупыми концами» представляет собой дцРНК, которая является двухцепочечной по всей ее длине, т. е., без выступающего нуклеотида на любом из концов молекулы. РНК средства по изобретению включают РНК средства с выступающими нуклеотидами на одном конце (т. е., средства с одним выступом и одним тупым концом) или с выступающими нуклеотидами на обоих концах.

Термин «антисмысловая цепь» или «направляющая цепь» относится к цепи иРНК, например, дцРНК, которая содержит область, которая по существу комплементарна целевой последовательности, например, мРНК AGT. Как используют в настоящем документе, термин «область комплементарности» относится к области в антисмысловой цепи, которая по существу комплементарна последовательности, например, целевой последовательности, например, нуклеотидной последовательности AGT, как определено в настоящем документе. Когда область комплементарности не полностью комплементарна целевой последовательности, несовпадения могут находиться во внутренних или концевых областях молекулы. В целом, наиболее позволительные несовпадения находятся в концевых областях, например, в пределах 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов 5'- и/или 3'-конца иРНК.

Термин «смысловая цепь» или «сопровождающая цепь», как используют в настоящем документе, относится к цепи иРНК, которая включает область, которая по существу комплементарна области антисмысловой цепи, как этот термин определяют в настоящем

документе.

Как используют в настоящем документе, термин «область расщепления» относится к области, которая расположена непосредственно смежно с сайтом расщепления. Сайт расщепления представляет собой сайт на мишени, в котором происходит расщепление. В некоторых вариантах осуществления область расщепления содержит три основания на любом из концов сайта расщепления и непосредственно смежно с ним. В некоторых вариантах осуществления область расщепления содержит два основания на любом из концов сайта расщепления и непосредственно смежно с ним. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления специфично встречается в сайте, ограниченном нуклеотидами 10 и 11 антисмысловой цепи, и область расщепления содержит нуклеотиды 11, 12 и 13.

Как используют в настоящем документе и если не указано иное, термин «комплементарный», когда используют для того, чтобы описывать первую нуклеотидную последовательность по отношению ко второй нуклеотидной последовательности, относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, образовывать гибрид и формировать структуру дуплекса при определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, как поймет специалист. Такие условия, например, могут представлять собой строгие условия, где строгие условия могут включать: 400 мМ NaCl, 40 мМ PIPES pH 6,4, 1 мМ EDTA, 50°C или 70°C в течение 12-16 часов, после чего следует промывание (см., например, «Molecular Cloning: Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press»). Можно применять другие условия, такие как физиологически релевантные условия, которые можно встретить внутри организма. Специалист сможет определять набор условий, наиболее подходящих для теста на комплементарность двух последовательностей в соответствии с предельным применением гибридизованных нуклеотидов.

Комплементарные последовательности внутри иРНК, например,

внутри дцРНК, как описано в настоящем документе, включают образование пар олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности в настоящем документе можно обозначать как «полностью комплементарные» по отношению друг к другу. Однако, когда в настоящем документе первую последовательность обозначают как «по существу комплементарную» по отношению ко второй последовательности, две последовательности могут быть полностью комплементарными или они могут формировать одну или несколько, но в целом не больше чем 5, 4, 3 или 2, несовпадающих пар оснований при гибридизации для дуплекса вплоть до 30 пар оснований, при этом сохраняя способность образовывать гибрид при условиях, наиболее релевантных для их предельного применения, например, ингибирования экспрессии гена через путь RISC. Однако, когда два олигонуклеотида конструируют для того, чтобы при гибридизации формировать один или несколько одноцепочечных выступов, такие выступы не следует рассматривать в качестве несовпадений в отношении определения комплементарности. Например, дцРНК, содержащую один олигонуклеотид 21 нуклеотид в длину и другой олигонуклеотид 23 нуклеотида в длину, в которой более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, все же можно обозначать как «полностью комплементарную» в целях, описанных в настоящем документе.

«Комплементарные» последовательности, как используют в настоящем документе, также могут включать или быть полностью сформированы из пар оснований не Уотсона-Крика и/или пар оснований, сформированных из неприродных и модифицированных нуклеотидов, постольку, поскольку выполняются приведенные выше требования в отношении их способности образовывать гибрид. Такие пары оснований не Уотсона-Крика включают, но не ограничиваясь этим, нестрого соответствующую G:U или пары оснований Хугстина.

Термины «комплементарный», «полностью комплементарный» и

«по существу комплементарный» в настоящем документе можно использовать в отношении совпадения пар между смысловой цепью и антисмысловой цепью дцРНК или между антисмысловой цепью иРНК средства и целевой последовательностью, как будет понятно из контекста их использования.

Как используют в настоящем документе, полинуклеотид, который «по существу комплементарен по меньшей мере части» информационной РНК (мРНК), относится к полинуклеотиду, который по существу комплементарен непрерывной части мРНК, представляющей интерес, (например, мРНК, кодирующая AGT). Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части мРНК AGT, если последовательность по существу комплементарна не прерывающейся части мРНК, кодирующей AGT.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды антисмысловой цепи, описанные в настоящем документе, полностью комплементарны целевой последовательности AGT. В других вариантах осуществления полинуклеотиды антисмысловой цепи, описанные в настоящем документе, по существу комплементарны целевой последовательности AGT и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% комплементарна по всей ее длине эквивалентной области нуклеотидной последовательности SEQ ID № 1 или фрагменту SEQ ID № 1, например, комплементарна приблизительно на 85%, приблизительно на 90% или приблизительно на 95%.

В одном из вариантов осуществления РНКи средство по изобретению включает смысловую цепь, которая по существу комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, комплементарен целевой последовательности AGT, и где полинуклеотид смысловой цепи содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% комплементарна по всей ее длине эквивалентной области нуклеотидной последовательности SEQ ID № 2 или какому-либо одному фрагменту SEQ ID № 2, например, комплементарна приблизительно на 85%, приблизительно на 90% или приблизительно на 95%.

В целом, большинство нуклеотидов в каждой цепи представляют собой рибонуклеотиды, но, как подробно описано в настоящем документе, каждая или обе цепи также могут включать один или несколько не рибонуклеотидов, например, дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, «иРНК» может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями. Такие модификации могут включать модификации всех типов, описанных в настоящем документе или известных в данной области. Любые такие модификации, как используют в молекуле иРНК, охвачены с помощью «иРНК» для целей этого описания и формулы изобретения.

В одном аспектов изобретения средство для использования в способах и композициях по изобретению представляет собой одноцепочечную антисмысловую молекулу РНК, которая ингибирует целевую мРНК через механизм антисмыслового ингибирования. Одноцепочечная антисмысловая молекула РНК комплементарна последовательности внутри целевой мРНК. Одноцепочечные антисмысловые олигонуклеотиды могут ингибировать трансляцию стехиометрическим образом посредством основания пар с мРНК и физического препятствования механизмам трансляции, см. Dias, N. et al., (2002) Mol Cancer Ther 1:347-355. Одноцепочечная антисмысловая молекула РНК может составлять приблизительно от 15 приблизительно до 30 нуклеотидов в длину и имеет последовательность, которая комплементарна целевой последовательности. Например, одноцепочечная антисмысловая молекула РНК может содержать последовательность, которая составляет по меньшей мере приблизительно 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше непрерывных нуклеотидов из какой-либо одной из антисмысловых последовательностей, описанных в настоящем документе.

Термин «ингибирование», как используют в настоящем документе, используют взаимозаменяемо со «снижением», «выключением гена», «понижающей регуляцией», «супрессией» и другими схожими терминами, и он включает любой уровень ингибирования.

Фраза «ингибирование экспрессии АГТ», как используют в настоящем документе, включает ингибирование экспрессии любого

гена AGT (такого как, например, ген AGT мыши, ген AGT крысы, ген AGT обезьяны или ген AGT человека), а также вариантов или мутантов гена AGT, которые кодируют белок AGT.

«Ингибирование экспрессии гена AGT» включает какой-либо уровень ингибирования гена AGT, например, по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена AGT, такую как ингибирование по меньшей мере приблизительно на 20%. В определенных вариантах осуществления происходит ингибирование по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 35%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 45%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 55%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 91%, по меньшей мере приблизительно на 92%, по меньшей мере приблизительно на 93%, по меньшей мере приблизительно на 94%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98% или по меньшей мере приблизительно на 99%.

Экспрессию гена AGT можно оценивать на основании уровня какой-либо переменной, связанной с экспрессией гена AGT, например, уровня мРНК AGT или уровня белка AGT. Ингибирование можно оценивать по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких из этих переменных по сравнению с контрольным уровнем. Контрольный уровень может представлять собой контрольный уровень любого типа, который используют в данной области, например, базовый уровень перед дозой или уровень, определяемый у схожего субъекта, клетки или образца, который не получал лечение или получал лечение с использованием контроля (например, такого как контроль только из буфера или контроль с неактивным средством).

В одном из вариантов осуществления по меньшей мере

частичную супрессию экспрессии гена AGT оценивают по снижению количества мРНК AGT, которую можно выделять из или обнаруживать в первой клетке или группе клеток, в которой происходит транскрипция гена AGT и которую лечили или лечат так, что ингибируют экспрессию гена AGT, по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичной первой клетке или группе клеток, но которую так не лечили или не лечат (контрольные клетки). Степень ингибирования можно выразить в единицах:

$$\left(\frac{\text{мРНК в контрольных клетках}}{\text{мРНК в клетках, получавших лечение}} \right) \times 100 / \left(\frac{\text{мРНК в контрольных клетках}}{\text{мРНК в контрольных клетках}} \right)$$

Фраза «приведение клетки в контакт с РНКи средством», таким как дцРНК, как используют в настоящем документе, включает приведение клетки в контакт с помощью любого возможного средства. Приведение клетки в контакт с РНКи средством включает приведение клетки в контакт *in vitro* с иРНК или приведение клетки в контакт *in vivo* с иРНК. Приведение в контакт можно осуществлять непосредственно или опосредованно. Таким образом, например, РНКи средство можно приводить в физический контакт с клеткой посредством индивидуального осуществления способа или, альтернативно, РНКи средство можно помещать в ситуацию, которая впоследствии будет допускать или вызывать его контакт с клеткой.

Приведение клетки в контакт *in vitro* можно осуществлять, например, посредством инкубирования клетки с РНКи средством. Приведение клетки в контакт *in vivo* можно осуществлять, например, посредством инъекирования РНКи средства внутрь или около ткани, где расположена клетка, или посредством инъекции РНКи средства в другую область, например, кровотока или подкожное пространство, так, что средство впоследствии достигнет ткани, где расположена клетка, подлежащая контакту. Например, РНКи средство может содержать и/или быть сопряжено с лигандом, например, GalNAc3, который направляет РНКи средство в место, представляющее интерес, например, печень. Также возможна комбинация способов приведения в контакт *in vitro* и *in vivo*. Например, клетку также можно приводить в контакт *in vitro* с РНКи

средством и впоследствии трансплантировать субъекту.

В одном из вариантов осуществления приведение клетки в контакт с иРНК включает «введение» или «доставку иРНК в клетку» посредством облегчения или осуществления накопления или абсорбции внутри клетки. Абсорбция или накопление иРНК может происходить через спонтанные диффузионные или активные клеточные процесс или с помощью вспомогательных средств или устройств. Введение иРНК в клетку может происходить *in vitro* и/или *in vivo*. Например, для введения *in vivo*, иРНК можно инъецировать в участок ткани или вводить системно. Доставку *in vivo* также можно осуществлять посредством системы доставки бета-глюканов, такой как та, что описана в патентах США №№ 5032401 и 5607677 и публикации США № 2005/0281781, полное содержание которых настоящим включено в настоящий документ посредством ссылки. Введение в клетку *in vitro* включает известные в данной области способы, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны в настоящем документе далее и/или известны в данной области.

Термин «липидная наночастица» или «LNP» обозначает везикулу, которая содержит липидный слой, инкапсулирующий фармацевтически активную молекулу, такую как молекула нуклеиновой кислоты, например, иРНК или плазида, с которой происходит транскрипция иРНК. LNP описаны, например, в патентах США №№ 6858225, 6815432, 8158601 и 8058069, полное содержание которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Как используют в настоящем документе, «субъект» представляет собой животное, такое как млекопитающее, включая примата (такого как человек, не являющийся человеком примат, например, марьяшка и шимпанзе), не примат (такое как корова, свинья, верблюда, лама, лошадь, коза, кролик, овца, хомяк, морская свинка, кошка, собака, крыса, мышь, лошадь и кит) или птица (например, утка или гусь). В одном из вариантов осуществления субъектом является человек, такой как человек, которого лечили или оценивали на предмет заболевания, нарушения или состояния, для которых будет полезно снижение экспрессии АГТ; человек с риском заболевания, нарушения или состояния, для

которых будет полезно снижение экспрессии AGT; человек, который имеет заболевание, нарушение или состояние, для которых будет полезно снижение экспрессии AGT; и/или человек, которого лечили на предмет заболевания, нарушения или состояния, для которых будет полезно снижение экспрессии AGT, как описано в настоящем документе.

Как используют в настоящем документе, термины «лечить» или «лечение» относятся к полезному или желаемому результату, включая в качестве неограничивающих примеров облегчение или уменьшение интенсивности одного или нескольких симптомов, связанных с нежелательной экспрессией AGT, таких как активация рецептора ангиотензина II 1-го типа (AT₁R) (например, гипертензия, хроническая почечная недостаточность, инсульт, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, аневризма, заболевание периферических артерий, заболевание сердца, повышенный окислительный стресс, например, повышенное образование супероксидов, воспаление, вазоконстрикция, задержка натрия и воды, потеря калия и магния, супрессия ренина, гипертрофия миоцитов и гладких мышц, увеличенный синтез коллагена, стимуляция фиброза сосудов, миокарда и почек, увеличенная частота и сила сердечных сокращений, измененная частота сердечных сокращений, например, увеличенная аритмия, стимуляция ингибитора активатора плазминогена 1 (PAI1), активация симпатической нервной системы и увеличенная секреция эндотелина), симптомы гипертензии, ассоциированной с беременностью, (например, предэклампсия и эклампсия), включая в качестве неограничивающих примеров задержку внутриутробного развития (IUGR) или задержку развития плода, симптомы, связанные со злокачественной гипертензией, симптомы, связанные с гиперальдостеронизмом; снижение степени нежелательной активации AT₁R; стабилизацию (т. е. не ухудшение) состояния хронической активации AT₁R; уменьшение интенсивности или облегчение нежелательной активации AT₁R (например, гипертензия, хроническая почечная недостаточность, инсульт, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, аневризма, заболевание периферических артерий, заболевание сердца, увеличенный окислительный стресс, например,

увеличенное образование супероксидов, воспаление, вазоконстрикция, задержка натрия и воды, потеря калия и магния, супрессия ренина, гипертрофия миоцитов и гладких мышц, увеличенный синтез коллагена, стимуляция фиброза сосудов, миокарда и почек, увеличенная частота и сила сердечных сокращений, измененная частота сердечных сокращений, например, увеличенная аритмия, стимуляция ингибитора активатора плазминогена 1 (PAI1), активация симпатической нервной системы и увеличенная секреция эндотелина), поддающиеся обнаружению или неподдающиеся обнаружению. «Лечение» также может обозначать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в отсутствие лечения.

Термин «более низкий» в контексте уровня AGT у субъекта или маркера или симптома заболевания относится к статистически значимому снижению такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или больше и предпочтительно опускается до уровня, принятого в качестве диапазона нормы для индивидуума без такого нарушения.

Как используют в настоящем документе, «предотвращение» или «предотвращать», когда используют по отношению к заболеванию, нарушению или состоянию, для которого будет полезно снижение экспрессии гена AGT, относится к снижению вероятности того, что у субъекта разовьется симптом, связанный с таким заболеванием, нарушением или состоянием, например, симптом нежелательной активации AT₁R, такой как гипертензия, хроническая почечная недостаточность, инсульт, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, аневризма, заболевание периферических артерий, заболевание сердца, увеличенный окислительный стресс, например, увеличенное образование супероксидов, воспаление, вазоконстрикция, задержка натрия и воды, потеря калия и магния,

супрессия ренина, гипертрофия миоцитов и гладких мышц, увеличенный синтез коллагена, стимуляция фиброза сосудов, миокарда и почек, увеличенная частота и сила сердечных сокращений, измененная частота сердечных сокращений, например, увеличенная аритмия, стимуляция ингибитора активатора плазминогена 1 (РАI1), активация симпатической нервной системы и увеличенная секреция эндотелина. Вероятность развития, например, гипертензии, снижается, например, когда у индивидуума, имеющего один или несколько факторов риска для гипертензии, или не может развиваться гипертензия или развивается гипертензия с меньшей тяжестью относительно популяции, имеющей те же факторы риска и не получающей лечение, как описано в настоящем документе. Невозможность развития заболевания, нарушения или состояния или снижение развития симптома, связанного с таким заболеванием, нарушением или состоянием (например, по меньшей мере приблизительно на 10% по клинически принятой шкале для этого заболевания или нарушения) или проявление отложенных симптомов (например, на сутки, недели, месяцы или годы) считают эффективным предотвращением.

Как используют в настоящем документе, термин «заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном» или «AGT-ассоциированное заболевание» представляет собой заболевание или нарушение, которое обусловлено активацией ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (RAAS) или связано с ней, или заболевание или нарушение, симптомы которого или прогрессирование которого отвечает на инактивацию RAAS. Термин «заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном», включает заболевание, нарушение или состояние, для которого будет полезно снижение экспрессии AGT. Такие заболевания типично связаны с высоким кровяным давлением. Неограничивающие примеры заболевания, ассоциированного с ангиотензиногеном, включают гипертензию, например, пограничную гипертензию (также известный как прегипертензия), первичную гипертензию (также известную как эссенциальная гипертензия или идеопатическая гипертензия), вторичную гипертензию (также известную как неэссенциальная гипертензия), гипертонический криз (также известный как злокачественная гипертензия), экстренное

гипертензивное состояние, изолированную систолическую или диастолическую гипертензию, гипертензию, ассоциированную с беременностью, (например, предэклампсия, эклампсия и послеродовая предэклампсия), диабетическую гипертензию, резистентную гипертензию, рефракторную гипертензию, пароксизмальную гипертензию, реноваскулярную гипертензию (также известную как почечная гипертензия), гипертензию Голдблатта, глазную гипертензию, глаукому, легочную гипертензию, портальную гипертензию, системную венозную гипертензию, систолическую гипертензию, лабильную гипертензию; гипертензивную кардиопатию, гипертензивную нефропатию, атеросклероз, артериосклероз, васкулопатию (в том числе заболевание периферических сосудов), диабетическую нефропатию, диабетическую ретинопатию, хроническую сердечную недостаточность, кардиомиопатию, диабетическую кардиомиопатию, гломерулосклероз, коарктацию аорты, аневризму аорты, фиброз желудочков, синдром Кушинга и другие состояния избытка глюкокортикоидов, в том числе хроническая стероидная терапия, феохромоцитома, ренинома, вторичный альдостеронизм, и другие состояния избытка минералокортикоидов, апноэ во сне, заболевание щитовидной/паращитовидной железы, сердечную недостаточность (например, нарушение систолической функции левого желудочка), инфаркт миокарда, стенокардию, инсульт, сахарный диабет (например, диабетическая нефропатия), заболевание почек, например, хроническую почечную недостаточность или диабетическую нефропатию, необязательно в контексте беременности, почечную недостаточность, например, хроническая почечная недостаточность, нарушение когнитивной функции (такой как болезнь Альцгеймера) и системный склероз (например, склеродермический почечный криз). В определенных вариантах осуществления AGT-ассоциированное заболевание включает задержку внутриутробного развития (IUGR) или задержку развития плода.

На основании усредненных показаний кровяного давления в положении сидя, которые должным образом изменяют во время двух или более посещений клиники, субъект, который имеет нормальное кровяное давление, является тем, кто имеет систолическое

давление приблизительно 90-119 мм рт. ст. (приблизительно 12-15,9 кПа (кН/м²)) и диастолическое давление приблизительно 60-79 мм рт. ст. (приблизительно 8,0-10,5 кПа (кН/м²)); субъект, который имеет прегипертензию, является тем, кто имеет систолическое давление приблизительно 120-139 мм рт. ст. (приблизительно 16,1-18,5 кПа (кН/м²)) и диастолическое давление приблизительно 60-79 мм рт. ст. (приблизительно 8,0-10,5 кПа (кН/м²)); субъект, который имеет гипертензию (например, гипертензию I степени), является тем, кто имеет систолическое давление приблизительно 140-159 мм рт. ст. (приблизительно 18,7-21,2 кПа (кН/м²)) и диастолическое давление приблизительно 90-99 мм рт. ст. (приблизительно 12,0-13,2 кПа (кН/м²)); и субъект, который имеет гипертензию (например, гипертензию II степени), является тем, кто имеет систолическое давление приблизительно ≥ 160 мм рт. ст. (приблизительно $\geq 21,3$ кПа (кН/м²)) и диастолическое давление приблизительно ≥ 100 мм рт. ст. (приблизительно $\geq 13,3$ кПа (кН/м²)). Субъекты с кровяным давлением выше 130/80 мм рт. ст. наряду с диабетом 1-го и 2-го типов или заболеванием почек, считают имеющим гипертензию.

В одном из вариантов осуществления заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, представляет собой первичную гипертензию. «Первичная гипертензия» представляет собой результат экологических или генетических причин (например, результат без очевидных медицинских первопричин).

В одном из вариантов осуществления заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, представляет собой вторичную гипертензию. «Вторичная гипертензия» имеет идентифицируемое нарушение, лежащее в основе, которое может иметь множественную этиологию, включая почечные, сосудистые и эндокринные причины, например, заболевание паренхимы почек (например, поликистозные почки, заболевание клубочков или интерстиция), почечное сосудистое заболевание (например, стеноз почечной артерии, фиброзно-мышечная дисплазия), эндокринные нарушения (например, избыток адренокортикостероидов или минералокортикоидов, феохромоцитома, гипертиреозидизм или

гипотиреозидизм, избыток гормона роста, гиперпаратиреозидизм), коарктацию аорты или использование оральных контрацептивов.

В одном из вариантов осуществления заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, представляет собой гипертонический криз, например, злокачественную гипертензию и прогрессирующую гипертензию. «Прогрессирующая гипертензия» представляет собой резко повышенное кровяное давление (т. е. равное или превышающее систолическое 180 мм рт. ст. или диастолическое 110 мм рт. ст.) с непосредственным повреждением одного или нескольких конечных органов. Кровяное давление следует снижать незамедлительно, чтобы предотвращать дальнейшее повреждение органов. «Злокачественная гипертензия» представляет собой резко повышенное кровяное давление (т. е. равное или превышающее систолическое 180 мм рт. ст. или диастолическое 110 мм рт. ст.) при непосредственном повреждении одного или нескольких конечных органов и отеке зрительного нерва. Кровяное давление нужно снижать незамедлительно для того, чтобы предотвращать дальнейшее повреждение органа. Повреждение неврологического конечного органа из-за неконтролируемого кровяного давления может включать гипертензивную энцефалопатию, обострение в сосудах головного мозга/церебральный инфаркт; субарахноидальную геморрагию и/или внутричерепную геморрагию. Повреждение конечного органа сердечнососудистой системы может включать ишемию/инфаркт миокарда, острое нарушение функции левого желудочка, острый отек легких и/или расслоение аорты. Другие системы органов также могут быть повреждены неконтролируемой гипертензией, которая может вести к острой почечной недостаточности, ретинопатии, эклампсии или микроангиопатической гемолитической анемии.

В одном из вариантов осуществления заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, представляет собой экстренное гипертензивное состояние. «Экстренное гипертензивное состояние» представляет собой резко повышенное кровяное давление (т. е., равное или превышающее систолическое 180 мм рт. ст. или диастолическое 110 мм рт. ст.) без непосредственного повреждения одного или нескольких органов. Кровяное давление можно безопасно

снижать в пределах нескольких часов.

В одном из вариантов осуществления заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, представляет собой гипертензию, ассоциированную с беременностью, например, хроническую гипертензию беременных, гипертензию беременных, предэклампсию, эклампсию, предэклампсию, накладывающуюся на хроническую гипертензию, HELLP синдром и гипертензию беременных (также известную как транзиторная гипертензия беременных, хроническую гипертензию, идентифицированную во второй половине беременности, и гипертензию, вызванную беременностью (PIH)). Субъект, который имеет «хроническую гипертензию беременных», представляет собой того, кто имеет кровяное давление, превышающее 140/90 мм рт. ст. перед беременностью или до 20 недель беременности. «Гипертензия беременных» или «гипертензия, вызванная беременностью» относится к гипертензии с началом в последней части беременности (>20 недель беременности) без каких-либо других признаков предэклампсии, после чего следует нормализация кровяного давления после родов. «Легкую предэклампсию» определяют как присутствие гипертензии (кровяное давление $\geq 140/90$ мм рт. ст.) два раза с интервалом по меньшей мере в 6 часов, но без признаков повреждения конечного органа, у женщины, которая имела нормальное давление до 20 недель беременности. У субъекта с предсуществующей эссенциальной гипертензией, предэклампсию диагностируют, если систолическое кровяное давление повышено на 30 мм рт. ст. или если диастолическое кровяное давление повышено на 15 мм рт. ст. «Тяжелую предэклампсию» определяют как присутствие одного из следующих симптомов или признаков в присутствии предэклампсии; систолическое кровяное давление 160 мм рт. ст. или выше или диастолическое кровяное давление 110 мм рт. ст. или выше два раза с интервалом по меньшей мере в 6 часов; протеинурия больше чем 5 г при сборе в течение 24 часов или больше, чем 3+ в двух случайных образцах мочи, собранных с интервалом по меньшей мере четыре часа, отек легких или цианоз, олигурия (< 400 мл за 24 часа), персистирующие головные боли, боль в эпигастрии и/или

сниженная функция печени, тромбоцитопения, олигогидрамнион, замедленный рост плода или отслоение плаценты. «Эклампсию» определяют как приступы, которые не могут быть свойственны другим причинам, у женщины с предэклампсией. «HELLP синдром» (также известный как гестоз типа В с отеками, протеинурией и гипертензией) представляет собой гемолиз, повышенные уровни ферментов печени и низкие уровни тромбоцитов у беременного субъекта.

В одном из вариантов осуществления заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, представляет собой резистентную гипертензию. «Резистентная гипертензия» представляет собой кровяное давление, которое остается выше целевого (например, 140/90 мм рт. ст.), несмотря на сопутствующее использование трех антигипертензивных средств различных классов, одним из которых является тиазидный диуретик. Субъекты, кровяным давлением которых управляют с использованием четырех или больше лекарственных средств, также считают имеющими резистентную гипертензию.

«Терапевтически эффективное количество», как используют в настоящем документе, предназначено для того, чтобы включать количество РНКи средства, которое при введении субъекту, который имеет заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, является достаточным для осуществления лечения заболевания (например, посредством уменьшения, улучшения или поддержания существующего заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания). «Терапевтически эффективное количество» может варьировать в зависимости от РНКи средства, того, как средство вводят, заболевания и его тяжести и анамнеза, возраста, массы, семейного анамнеза, генетического профиля, типов предшествующего или сопутствующего лечения, если имеет место, и других индивидуальных характеристик субъекта, подлежащего лечению.

«Профилактически эффективное количество», как используют в настоящем документе, предназначено для того, чтобы включать количество иРНК, которое при введении субъекту, который имеет заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, является достаточным для того, чтобы предотвращать или улучшать

заболевание или один или несколько симптомов заболевания у субъекта, восприимчивого к заболеванию, т. е. более склонного страдать от заболевания, чем те, что в общей популяции, из-за одного или нескольких факторов, например, возраста, массы, беременности. Улучшение заболевания включает замедление течения заболевания или снижение тяжести заболевания, развивающегося позднее. «Профилактически эффективное количество» может варьировать в зависимости от ИРНК, того, как средство вводят, степени риска заболевания и анамнеза, возраста, массы, семейного анамнеза, генетического профиля, типов предшествующего или сопутствующего лечения, если имеет место, и других индивидуальных характеристик пациента, подлежащего лечению.

«Терапевтически эффективное количество» или «профилактически эффективное количество» также включает количество РНКи средства, которое вызывает некоторый желаемый местный или системный эффект при обоснованном соотношении польза/риск в применении к какому-либо лечению. ИРНК, используемую в способах по настоящему изобретению, можно вводить в достаточном количестве, чтобы достигать обоснованного соотношения польза/риск в применении к такому лечению.

Фразу «фармацевтически приемлемый» используют в настоящем документе, чтобы отослать к тем соединениям, материалам, композициям и/или дозированным формам, которые, в пределах объема здравого медицинского суждения, пригодны для использования в контакте с тканями субъектов-людей и субъектов-животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергического ответа или другой проблемы или осложнения, в соответствии с обоснованным соотношением польза/риск.

Фраза «фармацевтически приемлемый носитель», как используют в настоящем документе, обозначает фармацевтически приемлемый материал, композицию или наполнитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент, технологическая добавка (например, смазывающее средство, тальк, стеарат магния, кальция или цинка или стеариновая кислота) или материал, инкапсулирующий растворитель, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения из одного органа или

части организма в другой орган или часть организма. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами состава и не причинять вред субъекту, подлежащему лечению. Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) смазки, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк; (8) эксципиенты, такие как кокосовое масло и воски для суппозитория; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, сезамовое масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апиrogenную воду; (17) изотонический физиологический раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) pH буферные растворы; (21) сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; (22) наполнители, такие как полипептиды и аминокислоты (23) компоненты сыворотки, такие как сывороточный альбумин, HDL и LDL; и (22) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

Термин «образце», как используют в настоящем документе, включает совокупность схожих текучих веществ, клеток или тканей, выделенных у субъекта, а также текучих веществ, клеток или тканей, присутствующих внутри субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку и серозные текучие вещества, плазму, цереброспинальное текучее вещество, глазные текучие вещества, лимфу, мочу, слюну и т. п. Образцы тканей могут включать образцы из тканей, органов или локализованных областей. Например, образцы можно извлекать из конкретных органов, частей органов или текучих веществ или клеток внутри этих органов. В

определенных вариантах осуществления образцы можно извлекать из печени (например, цельной печени или определенных сегментов печени или клеток печени определенных типов, например, таких как гепатоциты). В некоторых вариантах осуществления «образец, полученный у субъекта» относится к крови или плазме, взятой у субъекта.

II. иРНК по изобретению

Настоящее изобретение предусматривает иРНК, которые ингибируют экспрессию гена AGT. В одном из вариантов осуществления иРНК средство включает молекулы двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии гена AGT в клетке, такой как клетка внутри субъекта, например, млекопитающего, такого как человек, имеющий заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, например, гипертензию. дцРНК содержит антисмысловую цепь, которая имеет область комплементарности, которая комплементарна по меньшей мере части мРНК, сформированной при экспрессии гена AGT. Область комплементарности составляет приблизительно 30 нуклеотидов или меньше в длину (например, приблизительно 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19 или 18 нуклеотидов или меньше в длину). После контакта с клеткой, экспрессирующей ген AGT, иРНК ингибирует экспрессию гена AGT (например, ген AGT человека, примата, не примата или птицы) по меньшей мере приблизительно на 10%, как оценивают, например, с помощью ПЦР или способа, основанного на разветвленной ДНК (bDNA), или с помощью способа, основанного на белке, например, посредством анализа иммунофлуоресценции, с использованием, например, способов вестерн-блоттинга или проточной цитометрии.

дцРНК содержит две цепи РНК, которые комплементарны и образуют гибрид для того, чтобы формировать структуру дуплекса в условиях, в которых будут использовать дцРНК. Одна цепь дцРНК (антисмысловая цепь) содержит область комплементарности, которая по существу комплементарна и в целом полностью комплементарна целевой последовательности. Целевую последовательность можно получать из последовательности мРНК, сформированной во время экспрессии гена AGT. Другая цепь (смысловая цепь) содержит

область, которая комплементарна антисмысловой цепи, так что две цепи образуют гибрид и формируют структуру дуплекса при объединении в подходящих условиях. Как описано в другом месте в настоящем документе и как известно в данной области, комплементарные последовательности дцРНК также могут в виде самокомплементарных областей входить в состав единой молекулы нуклеиновой кислоты в противоположность нахождению в отдельных олигонуклеотидах.

В целом, структура дуплекса составляет между 15 и 30 парами оснований в длину, например, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пар оснований в длину. Диапазоны и длины между приведенными выше диапазонами и длинами также предусмотрены в качестве части изобретения.

Аналогичным образом, область комплементарности с целевой последовательностью составляет между 15 и 30 нуклеотидами в длину, например, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида в длину. Диапазоны и длины между приведенными выше диапазонами и длинами также предусмотрены в качестве части изобретения.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК составляет приблизительно от 15 приблизительно до 20 нуклеотидов в длину, приблизительно от 25 приблизительно до 30 нуклеотидов в длину или приблизительно от 15 приблизительно до 23 нуклеотидов в длину. В целом, дцРНК имеет достаточную длину, чтобы служить в качестве субстрата для фермента дайсер. Например, в данной области хорошо известно, что дцРНК больше приблизительно 21-23

нуклеотидов в длину могут служить в качестве субстратов для дайсера. Также специалист признает, что, как правило, область РНК, на которую нацелено расщепление, наиболее часто является частью более крупной молекулы РНК, часто молекулы мРНК. В соответствующих случаях, «часть» целевой мРНК представляет собой непрерывную последовательность целевой мРНК достаточной длины для того, чтобы она могла быть субстратом для РНКи-направленного расщепления (т. е., расщепления через путь RISC).

Специалист в данной области также признает, что дуплексная область представляет собой основную функциональную часть дцРНК, например, дуплексная область приблизительно от 9 до 36 пар оснований, например, приблизительно 10-36, 11-36, 12-36, 13-36, 14-36, 15-36, 9-35, 10-35, 11-35, 12-35, 13-35, 14-35, 15-35, 9-34, 10-34, 11-34, 12-34, 13-34, 14-34, 15-34, 9-33, 10-33, 11-33, 12-33, 13-33, 14-33, 15-33, 9-32, 10-32, 11-32, 12-32, 13-32, 14-32, 15-32, 9-31, 10-31, 11-31, 12-31, 13-32, 14-31, 15-31, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований. Таким образом, в одном из вариантов осуществления до такой степени, что она подвергается процессингу до функционального дуплекса, например, из 15-30 пар оснований, который направлен на желаемую РНК для расщепления, РНК молекула или комплекс РНК молекул, имеющих дуплексную область больше чем 30 пар оснований, представляет собой дцРНК. Таким образом, как правило, специалист в данной области признает, что в одном из вариантов осуществления мкРНК представляет собой дцРНК. В другом варианте осуществления дцРНК не является встречающейся в природе мкРНК. В другом варианте осуществления иРНК средство, которое можно использовать для направленного воздействия на экспрессию АГТ, не генерируют в целевой клетке посредством расщепления более крупной дцРНК.

дцРНК, как описано в настоящем документе, дополнительно

может содержать один или несколько одноцепочечных выступающих нуклеотидов, например, 1, 2, 3 или 4 нуклеотида. дцРНК, содержащая по меньшей мере один выступающий нуклеотид, может иметь неожиданно превосходящие ингибиторные свойства по отношению к их аналогам с тупыми концами. Выступающий нуклеотид может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозид, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Выступ(выступы) может быть на смысловой цепи, антисмысловой цепи или каком-либо их сочетании. Кроме того, нуклеотид(нуклеотиды) выступа могут быть представлены на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах их антисмысловой или смысловой цепи дцРНК. Как рассмотрено в настоящем документе, увеличенный выступ вплоть до 30 нуклеотидов в длину также предусмотрен в различных вариантах осуществления изобретения.

дцРНК можно синтезировать стандартными способами, известными в данной области, как дополнительно рассмотрено далее, например, с использованием автоматизированного синтезатора ДНК, такого как коммерчески доступно, например, в Biosearch, Applied Biosystems®, Inc.

Соединения иРНК по изобретению можно получать с использованием двухстадийной процедуры. Сначала отдельно получают отдельные цепи двухцепочечной молекулы РНК. Затем составляющие цепи ренатурируют. Отдельные цепи соединения миРНК можно получать с использованием органического синтеза в растворе или на твердой фазе или и того и другого. Органический синтез дает такое преимущество, что можно легко получать олигонуклеотидные цепи, содержащие неприродные или модифицированные нуклеотиды. Одноцепочечные олигонуклеотиды по изобретению можно получать с использованием органического синтеза в растворе или на твердой фазе или и того и другого.

В одном из аспектов дцРНК по изобретению содержит по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность. Смысловую цепь выбирают из группы последовательностей, предоставленных в любой одной из таблиц 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15, и соответствующую

антисмысловую цепь для смысловой цепи выбирают из группы последовательностей в любой одной из таблиц 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, причем одна из последовательностей по существу комплементарна последовательности мРНК, образуемой при экспрессии гена AGT. По существу, в этом аспекте, дцРНК содержит два олигонуклеотиды, где один олигонуклеотид описан как смысловая цепь в любой одной из таблиц 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15 и второй олигонуклеотид описан как соответствующая антисмысловая цепь для смысловой цепи в любой одной из таблиц 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15. В одном из вариантов осуществления по существу комплементарные последовательности дцРНК содержатся в отдельных олигонуклеотидах. В другом варианте осуществления по существу комплементарные последовательности дцРНК содержатся в одном олигонуклеотиде.

Понятно, что, несмотря на то, что некоторые из последовательностей в таблицах 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15 описаны как модифицированные и/или конъюгированные последовательности, РНК из иРНК по изобретению, например, дцРНК по изобретению, может содержать какую-либо одну из последовательностей, изложенных в таблицах 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15, которая является немодифицированной, неконъюгированной и/или модифицированной и/или конъюгированной иначе, чем описано там.

В другом аспекте двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК) по изобретению для ингибирования экспрессии ангиотензиногена содержит, состоит по существу из или состоит из смысловой цепи и антисмысловой цепи, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность смысловой цепи в таблице 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15 и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность соответствующей антисмысловой цепи в таблицах 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15.

Специалист хорошо осведомлен о том, что дцРНК, имеющую структуру дуплекса из приблизительно от 20 до 23 пар оснований, например, из 21 пары оснований, считают особенно эффективной для индукции РНК-интерференции (Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888). Однако другие обнаружили, что более короткие или более

длинные структуры РНК дуплексов также могут быть эффективны (Chu and Rana (2007) RNA 14:1714-1719; Kim et al. (2005) Nat Biotech 23:222-226). В описанных выше вариантах осуществления, благодаря свойствам олигонуклеотидных последовательностей, предоставленных в любой одной из таблиц 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15, дцРНК, описанные в настоящем документе, могут содержать по меньшей мере одну цепь длиной минимум 21 нуклеотид. Можно обоснованно ожидать, что более короткие дуплексы, имеющие одну из последовательностей из любой одной из таблиц 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15 минус лишь несколько нуклеотидов на одном или обоих концах могут быть аналогичным образом эффективны по сравнению с дцРНК, описанными выше. Таким образом, предусмотрено, что дцРНК, имеющая последовательность по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше непрерывных нуклеотидов, полученную из одной из последовательностей из любой одной из таблиц 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15 и отличающуюся своей способностью ингибировать экспрессию гена AGT не больше чем приблизительно на 5, 10, 15, 20, 25, или 30% ингибирования от дцРНК, содержащей полную последовательность, входит в объем настоящего изобретения.

Кроме того, РНК, предоставленная в любой одной из таблиц 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15, идентифицирует сайт(сайты) в транскрипте AGT, который восприимчив к RISC-опосредованному расщеплению. По существу, настоящее изобретение дополнительно отличается иРНК, которые направлены на один из этих сайтов. Как используют в настоящем документе, иРНК называют направленной в конкретный сайт РНК транскрипта, если иРНК способствует расщеплению транскрипта в любом месте внутри этого конкретного сайта. Такая иРНК в целом содержит по меньшей мере приблизительно 15 непрерывных нуклеотидов из одной из последовательностей, предоставленных в любой одной из таблиц 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15, сопряженных с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из области, прилегающей к выбранной последовательности в гене AGT.

Хотя целевая последовательность в целом составляет приблизительно 15-30 нуклеотидов в длину, имеет место широкая вариация в пригодности конкретных последовательностей в этом

диапазоне для того, чтобы направлять расщепление какой-либо данной целевой РНК. Различные пакеты программного обеспечения и руководства, приведенные в настоящем документе, предоставляют рекомендации по идентификации оптимальных целевых последовательностей для какого-либо заданного целевого гена, но также можно использовать эмпирический подход, в котором «окно» или «маску» заданного размера (в качестве неограничивающего примера, 21 нуклеотид) дословно или фигурально (в том числе, например, *in silico*) помещают на целевую последовательность РНК для того, чтобы идентифицировать последовательности в конкретном диапазоне размеров, которые могут служить в качестве целевых последовательностей. Перемещая «окно» последовательности постепенно на один нуклеотид выше или ниже по направлению считывания от начального местоположения целевой последовательности, можно идентифицировать следующую потенциальную целевую последовательность, пока не идентифицируют полный набор возможных последовательностей для какого-либо выбранного заданного целевого размера. Этот процесс, сопряженный с систематическим синтезом и тестированием идентифицированных последовательностей (используя анализы, как описано в настоящем документе или как известно в данной области) для того, чтобы идентифицировать те последовательности, которые функционируют оптимально, позволяет идентифицировать те последовательности РНК, которые при направленном воздействии с использованием иРНК средства, опосредуют наилучшее ингибирование экспрессии гена-мишени. Таким образом, хотя последовательности, идентифицированные, например, в любой одной из таблиц 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15, представляют эффективные целевые последовательности, предусмотрено, что дополнительной оптимизации эффективности ингибирования можно достичь посредством постепенного «перемещения окна» на один нуклеотид выше или ниже по направлению считывания заданных последовательностей для того, чтобы идентифицировать последовательности с равными или более хорошими характеристиками ингибирования.

Кроме того, предусмотрено, что для какой-либо

идентифицированной последовательности, например, в любой одной из таблиц 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15, можно достигать дополнительной оптимизации посредством систематического добавления или удаления нуклеотидов для того, чтобы генерировать более длинные или более короткие последовательности, и тестирования тех последовательностей, генерируемых посредством перемещения окна большего или меньшего размера вверх или вниз по целевой РНК от этой точки. Также, сопряжение этого подхода с генерацией новых мишеней-кандидатов и тестированием эффективности иРНК на основании тех целевых последовательностей в анализе ингибирования, как известно в данной области и/или как описано в настоящем документе, может вести к дополнительному усовершенствованию эффективности ингибирования. Кроме того, такие оптимизированные последовательности можно корректировать, например, посредством введения модифицированных нуклеотидов, как описано в настоящем документе или как известно в данной области, добавления или изменений в выступе или других модификаций, как известно в данной области и/или рассмотренно в настоящем документе, чтобы дополнительно оптимизировать молекулу (например, увеличение стабильности в сыворотке или время полужизни в циркуляции, увеличение тепловой стабильности, увеличение трансмембраной доставки, направленное воздействие на конкретное местоположение или тип клеток, увеличение взаимодействия с ферментами путем выключения генов, увеличение высвобождения из эндосом) в качестве ингибитора экспрессии.

иРНК, как описано в настоящем документе, может содержать одно или несколько несовпадений с целевой последовательностью. В одном из вариантов осуществления иРНК, как описано в настоящем документе, содержит не больше чем 3 несовпадения. Если антисмысловая цепь иРНК содержит несовпадения с целевой последовательностью, предпочтительно эта область несовпадения не расположена в центре области комплементарности. Если антисмысловая цепь иРНК содержит несовпадения с целевой последовательностью, предпочтительно несовпадение ограничено нахождением в пределах последних 5 нуклеотидов с 5'- или 3'-конца

области комплементарности. Например, для иРНК средства из 23 нуклеотидов, цепь, которая комплементарна области гена AGT, в целом не содержит какое-либо несовпадение в пределах центральных 13 нуклеотидов. Способы, описанные в настоящем документе, или способы, известные в данной области, можно использовать для того, чтобы определять, эффективна ли иРНК, которая содержит несовпадение с целевой последовательностью, для ингибирования экспрессии гена AGT. Важно рассматривать эффективность иРНК с несовпадениями для ингибирования экспрессии гена AGT, в особенности, если известно, что в популяции конкретная область комплементарности в гене AGT имеет полиморфную вариацию последовательности.

III. Модифицированные иРНК по изобретению

В одном из вариантов осуществления РНК из иРНК по изобретению, например, дцРНК, является немодифицированной и не содержит, например, химические модификации и/или конъюгации, известные в данной области и описанные в настоящем документе. В другом варианте осуществления РНК из иРНК по изобретению, например, дцРНК, химически модифицируют для увеличения стабильности или других полезных характеристик. В определенных вариантах осуществления модифицируют по существу все нуклеотиды в иРНК по изобретению. В других вариантах осуществления изобретения, все нуклеотиды в иРНК по изобретению представляют собой модифицированные иРНК по изобретению, в которых «по существу все нуклеотиды модифицированы», главным образом, но полностью модифицированы и могут содержать не больше чем 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированный нуклеотид.

Нуклеиновые кислоты по изобретению можно синтезировать и/или модифицировать с помощью способов, точно установленных в данной области, таких как те, которые описаны в «Current protocols in nucleic acid chemistry», Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, которая настоящим включена в настоящий документ посредством ссылки. Модификации включают, например, модификации концов, например, модификации 5'-конца (фосфорилирование, конъюгация,

инвертированные связи) или модификации 3'-конца (конъюгация, ДНК нуклеотиды, инвертированные связи и т. д.); модификации оснований, например, замена на стабилизирующие основания, дестабилизирующие основания или основания, которые образуют пары оснований с расширенным репертуаром партнеров, удаление оснований (абазические нуклеотиды) или конъюгированные основания; модификации сахаров (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замена сахара; и/или модификации остова, в том числе модификация или замена фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры соединений иРНК, которые можно использовать в вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваясь этим, РНК, содержащие модифицированные остовы или не содержащие природные межнуклеозидные связи. РНК, имеющие модифицированные остовы, включают, среди прочих, те, которые не имеют атом фосфора в остове. Для целей этого описания и как иногда упоминают в данной области, модифицированные РНК, которые не имеют атом фосфора в их межнуклеозидном остове, также можно считать олигонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иРНК будет иметь атом фосфора в его межнуклеозидном остове.

Модифицированные остовы РНК включают, например, фосфортиоаты, хиральные фосфортиоаты, фосфородитиоаты, сложные фосфотриэфиры, сложные аминоалкилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, в том числе 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, в том числе 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, сложные тионоалкилфосфотриэфиры и боранфосфаты, имеющие нормальные 3'-5' связи, их 2'-5'-связанные аналоги и те, которые имеют инвертированную полярность, где смежные пары нуклеозидных звеньев связаны от 3'-5' к 5'-3' или от 2'-5' к 5'-2'. Также включены формы различных солей, смешанных солей и свободных кислот.

Репрезентативные патенты США, в которых изложено получение приведенных выше фосфорсодержащих связей, включают, но не ограничиваясь этим, патенты США №№ 3687808; 4469863; 4476301;

5023243; 5177195; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717;
5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925;
5519126; 5536821; 5541316; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361;
5625050; 6028188; 6124445; 6160109; 6169170; 6172209; 6,
239,265; 6277603; 6326199; 6346614; 6444423; 6531590; 6534639;
6608035; 6683167; 6858715; 6867294; 6878805; 7015315; 7041816;
7273933; 7321029; и патент США RE39464, полное содержание
каждого из которых настоящим включено в данный документ
посредством ссылки.

Модифицированные остовы РНК, которые не содержат в себе атом фосфора, имеют остовы, которые формируют посредством межнуклеозидных связей из алкилов или циклоалкилов с короткой цепью, смешанных гетероатомов и межнуклеозидных связей из алкилов или циклоалкилов или одной или нескольких гетероатомных или гетероциклических межнуклеозидных связей с короткой цепью. Они включают те, которые имеют морфолино-связи (частично сформированные из сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; ацетилсульфонидные и тиоацетилсульфонидные остовы; метилсульфонидные и тиометилсульфонидные остовы; алкен-содержащие остовы; сульфаматные остовы; метиленимино- и метиленигидразино-остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы; и другие, имеющие части из смешанных компонентов N, O, S и CH₂.

Репрезентативные патенты США, в которых изложено получение приведенных выше олигонуклеозидов, включают, но не ограничиваясь этим, патенты США №№ 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 5,64,562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677; 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5608046; 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437; и 5677439, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

В других вариантах осуществления для использования в иРНК предусмотрены подходящие РНК миметики, в которых и сахар и межнуклеозидную связь, т. е. остов, нуклеотидных звеньев заменяют на новые группы. Основные звенья сохраняют для гибридизации с подходящим целевым соединением нуклеиновой

кислоты. Одно такое олигомерное соединение, РНК миметик, у которого показано наличие превосходных гибридизационных свойств, обозначают как пептидо-нуклеиновая кислота (PNA). В PNA соединениях сахарный остов РНК заменяют на амидосодержащий остов, в частности аминоэтилглициновый остов. Нуклеиновые основания сохраняют и связывают непосредственно или опосредованно с аза атомами азота в амидной части остова. Репрезентативные патенты США, в которых изложено получение PNA соединений, включают, но не ограничиваясь этим, патенты США №№ 5539082; 5714331; и 5719262, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки. Дополнительные PNA соединения, пригодные для использования в иРНК по изобретению, описаны, например, в Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления изобретения включают РНК с фосфориоатными остовами и олигонуклеозиды с гетероатомными остовами и, в частности, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ [известный как метилен(метилимико) или MMI остов], $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ и $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ [в которых нативный фосфодиэфирный остов представлен как $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$] из указанного выше патента США № 5489677 и амидные остовы из указанного выше патента США № 5602240. В некоторых вариантах осуществления РНК, представленные в настоящем документе, имеют структуры морфолино-остова из указанного выше патента США № 5034506.

Модифицированные РНК также могут содержать один или несколько фрагментов замещенных сахаров. иРНК, например, дцРНК, представленные в настоящем документе, могут включать одно из следующего в 2'-положении: OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил; или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил может представлять собой замещенный или незамещенный C_1-C_{10} алкил или C_2-C_{10} алкенил и алкинил. Образцовые подходящие модификации включают $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ и $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, где n и m are составляют от 1 приблизительно до 10. В других вариантах

осуществления дцРНК содержит одно из следующего в 2'-положении: C₁-C₁₀ низший алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминокламино, полиалкиламино, замещенный силлил, расщепляющая РНК группа, репортерная группа, интеркалятор, группа для улучшения фармакокинетических свойств иРНК или группа для улучшения фармакодинамических свойств иРНК и другие заместители, имеющие схожие свойства. В некоторых вариантах осуществления модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), т. е., алкокси-алкоксильную группу. Другая образцовая модификация представляет собой 2'-диметиламинооксиэтокси, т. е. группу O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, также известную как 2'-DMAOE, как описано далее в примерах в настоящем документе, и 2'-диметиламиноэтоксиэтил (также известную в данной области как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), т. е. 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂. Кроме того, образцовые модификации включают: 5'-Me-2'-F нуклеотиды, 5'-Me-2'-OMe нуклеотиды, 5'-Me-2'-дезоксинуклеотиды, (как R-, так и S-изомеры в этих трех семействах); 2'-алкоксиалкил; и 2'-NMA (N-метилацетамид).

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH₃), 2'-аминопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) и 2'-фтор (2'-F). Схожие модификации также можно выполнять в других положениях в РНК в иРНК, в частности в 3'-положении сахара в 3'-концевом нуклеотиде или в 2'-5' связанной дцРНК и 5'-положений 5'-концевого нуклеотида. иРНК также могут иметь миметики сахаров, такие как фрагменты циклобутила, вместо сахара пентофуранозила. Репрезентативные патенты США, в которых изложено получение таких структур модифицированных сахаров, включают, но не ограничиваясь этим, патенты США №№ 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873;

5670633; и 5700920, некоторые из которых имеют того же заявителя, что и данная заявка. Полное содержание каждого из приведенных выше настоящим включено в настоящий документ посредством ссылки.

иРНК также может содержать модификации или замены нуклеиновых оснований (часто обозначаемых в данной области просто как «основания»). Как используют в настоящем документе, «немодифицированные» или «природные» нуклеиновые основания включают пуриновые основания аденин (А) и гуанин (G) и пиримидиновые основания тимин (Т), цитозин (С) и урацил (U). Модифицированные нуклеиновые основания включают другие синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как дезокситимин (dT), 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил- и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил- и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галоурацил и -цитозин, 5-пропинилурацил и -цитозин, 6-азоурацил, -цитозин и -тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-гало-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-гало-, в частности 5-бром-, 5-трифторметил- и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-деазааденин и 3-деазагуанин и 3-деазааденин. Дополнительные нуклеиновые основания включают те, которые раскрыты в патенте США № 3687808, те, которые раскрыты в *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, под редакцией Herdewijn, P., Wiley-VCH, 2008; те, которые раскрыты в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, страницы 858-859, под редакцией Kroschwitz, J. L, John Wiley & Sons, 1990, те, которые раскрыты в *Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613, и те, которые раскрыты в *Sanghvi, Y S., глава 15, dsRNA Research and Applications*, страницы 289-302, под редакцией Crooke S. T. и Lebleu B., CRC Press, 1993. Определенные из этих нуклеиновых оснований, в частности, можно использовать для повышения аффинности связывания олигомерных соединений по

изобретению. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и 0-6 замещенные пурины, в том числе 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Показывают, что замены 5-метилцитозином повышают стабильность дуплекса нуклеиновой кислоты на 0,6-1,2°C (под редакцией Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. и Lebleu, B., *dsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, стр. 276-278) и представляют собой образцовые замены оснований, еще более конкретно в комбинации с 2'-O-метоксиэтил-модификациями сахаров.

Репрезентативные патенты США, в которых изложено получение определенных из указанных выше модифицированных нуклеиновых оснований, а также других модифицированных нуклеиновых оснований, включают, но не ограничиваясь этим, указанные выше патенты США № 3687808, 4845205; 5,130,30; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121, 5596091; 5614617; 5681941; 5750692; 6015886; 6147200; 6166197; 6222025; 6235887; 6380368; 6528640; 6639062; 6617438; 7045610; 7427672; и 7495088, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

РНК в иРНК также можно модифицировать так, чтобы она включала одну или несколько закрытых нуклеиновых кислот (LNA). Закрытая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, который имеет модифицированный фрагмент рибозы, где фрагмент рибозы содержит дополнительный мостик, соединяющий 2' и 4' углероды. Эта структура эффективно «закрывает» рибозу в 3'-эндоструктурной конформации. Показано, что добавление закрытых нуклеиновых кислот в миРНК увеличивает стабильность миРНК в сыворотке и снижает эффекты за пределами мишени (Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. et al., (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193).

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид по изобретению содержит один или несколько мономеров, которые представляют собой UNA (незамкнутая нуклеиновая кислота)

нуклеотиды. UNA представляет собой незамкнутую ациклическую нуклеиновую кислоту, в которой удаляют любую из связей сахара, формируя незамкнутый остаток «сахара». В одном из примеров, UNA также охватывает мономер с удаленными связями между C_1' - C_4' (т. е. ковалентной связью углерод-кислород-углерод между углеродами C_1' и C_4'). В другом примере удалена связь C_2' - C_3' (т. е. ковалентная связь углерод-углерод между углеродами C_2' и C_3') сахара (см. Nuc. Acids Symp. Series, 52, 133-134 (2008) и Fluiter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039, включенные, таким образом, посредством ссылки).

РНК в иРНК также можно модифицировать так, чтобы она содержала один или несколько фрагментов бициклических сахаров. «Бициклический сахар» представляет собой кольцо фуранозила, модифицированное посредством образования мостика из двух атомов. «Бициклический нуклеозид» («BNA») представляет собой нуклеозид, который имеет фрагмент сахара, содержащий мостик, соединяющий два атома углерода в кольце сахара, тем самым формируя бициклическую кольцевую систему. В определенных вариантах осуществления мостик соединяет 4'-углерод и 2'-углерод в кольце сахара. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления средство по изобретению может включать одну или несколько закрытых нуклеиновых кислот (LNA). Закрытая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, который имеет модифицированный фрагмент рибозы, где фрагмент рибозы содержит дополнительный мостик, соединяющий 2' и 4' углероды. Другими словами, LNA представляет собой нуклеотид, который содержит бициклический фрагмент сахара, содержащий мостик 4'-CH₂-O-2'. Эта структура эффективно «закрывает» рибозу в 3'-эндоструктурной конформации. Показано, что добавление закрытых нуклеиновых кислот увеличивает стабильность мРНК в сыворотке и снижает эффекты за пределами мишени (Elmen, J. et al., (2005) Nucleic Acids Research 33(1):439-447; Mook, OR. et al., (2007) Mol Canc Ther 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003) Nucleic Acids Research 31(12):3185-3193). Примеры бициклических нуклеозидов для использования в полинуклеотидах по изобретению без ограничения

включают нуклеозиды, содержащие мостик между 4'- и 2'-атомами кольца рибозила. В определенных вариантах осуществления средства из антисмысловых полинуклеотидов по изобретению содержат один или несколько бициклических нуклеозидов, содержащих мостик от 4' к 2'. Примеры таких бициклических нуклеозидов с мостиками от 4' к 2' включают, но не ограничиваясь этим, 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (также обозначаемый как «конформационно затрудненный этил» или «сEt») и 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 7399845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278283); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278425); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (см., например, публикацию патента США № 2004/0171570); 4'-CH₂-N(R)-O-2', в котором R представляет собой H, C₁-C₁₂ алкил или защитную группу (см., например, патент США № 7427672); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (см., например, Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134); и 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278426). Полное содержание каждого из приведенных выше настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Дополнительные репрезентативные патенты США и публикации патентов США, в которых изложено получение нуклеотидов закрытых нуклеиновых кислот, включают, но не ограничиваясь этим, следующее: патенты США №№ 6268490; 6525191; 6670461; 6770748; 6794499; 6998484; 7053207; 7034133; 7084125; 7399845; 7427672; 7569686; 7741457; 8022193; 8030467; 8278425; 8278426; 8278283; US 2008/0039618; и US 2009/0012281, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Можно получать любой из приведенных выше бициклических нуклеозидов, имеющих одну или несколько стереохимических конфигураций сахаров, в том числе, например, α-L-рибофуранозу и β-D-рибофуранозу (см. WO 99/14226).

РНК в иРНК также можно модифицировать так, чтобы она содержала один или несколько конформационно затрудненных этилнуклеотидов. Как используют в настоящем документе, «конформационно затрудненный этилнуклеотид» или «сEt»

представляет собой закрытую нуклеиновую кислоту, которая содержит бициклический фрагмент сахара, содержащий мостик 4'-СН(СН₃)-О-2'. В одном из вариантов осуществления конформационно затрудненный этилнуклеотид находится в S конформации, что обозначают в настоящем документе как «S-cEt».

иРНК по изобретению также может содержать один или несколько «конформационно ограниченных нуклеотидов» («CRN»). CRN представляют собой нуклеотидные аналоги с линкером, соединяющим С₂' и С₄' углероды рибозы или С₃ и С₅' углероды рибозы. CRN закрывает кольцо рибозы в стабильной конформации и увеличивает аффинность гибридизации с мРНК. Линкер имеет достаточную длину, чтобы разместить кислород в оптимальном положении для стабильности и аффинности, что ведет к меньшей складчатости кольца рибозы.

Репрезентативные публикации, в которых изложено получение определенных из указанных выше CRN, включают, но не ограничиваясь этим, публикацию патента США № 2013/0190383; и публикацию РСТ WO 2013/036868, полное содержание каждой из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Один или несколько нуклеотидов в иРНК по изобретению также могут включать нуклеотид, замещенный гидроксиметилом. «Нуклеотид, замещенный гидроксиметилом» представляет собой ациклический 2'-3'-секо-нуклеотид, также обозначаемый как модификация «незамкнутой нуклеиновой кислоты» («UNA»).

Репрезентативные публикации США, в которых изложено получение UNA, включают, но не ограничиваясь этим, патент США № 8314227; и публикации патентов США №№ 2013/0096289; 2013/0011922; и 2011/0313020, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Потенциально стабилизирующие модификации концов молекул РНК могут включать N-(ацетиламинокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-ННас), N-(капроил-4-гидроксипролинол (Нур-С6), N-(ацетил-4-гидроксипролинол (Нур-ННас), тимидин-2'-О-дезокситимидин (простой эфир), N-(аминокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-амино), 2-докозаноил-уридин-3''-фосфат, инвертированное основание dT(idT) и

другие. Раскрытие этой модификации можно найти в публикации PCT WO 2011/005861.

Другие модификации нуклеотидов иРНК по изобретению включают 5'-фосфат или имитатор 5'-фосфата, например, 5'-концевой фосфат или имитатор фосфата на антисмысловой цепи РНКи средства. Подходящие имитаторы фосфата раскрыты, например, в публикации патента США № 2012/0157511, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

А. Модифицированные иРНК, содержащие мотивы по изобретению

В определенных аспектах изобретения средства из двухцепочечной РНКи по изобретению включают средства с химическими модификациями, как раскрыто, например, в предварительной заявке США № 61/561,710, поданной 18 ноября 2011 года, или в PCT/US2012/065691, поданной 16 ноября 2012 года, полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Как показано в настоящем документе и в предварительной заявке № 61/561,710 или заявке PCT № PCT/US2012/065691, превосходящий результат можно получать посредством введения одного или нескольких мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в смысловую цепь и/или антисмысловую цепь РНКи средства, в частности в сайт расщепления или около него. В остальном, в некоторых вариантах осуществления, смысловая цепь и антисмысловая цепь РНКи средства могут быть полностью модифицированными. Введение этих мотивов нарушает модификационный паттерн, если присутствуют, смысловой и/или антисмысловой цепи. РНКи средство необязательно можно конъюгировать с лигандом из производного GalNAc, например, на смысловой цепи. Получаемые РНКи средства представляют превосходящую активность выключения генов.

Более конкретно, к удивлению, обнаружено, что когда смысловая цепь и антисмысловая цепь средства из двухцепочечной РНКи полностью модифицированы, чтобы иметь один или несколько мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления или около него по меньшей мере в

одной цепи РНКи средства, у РНКи средства происходило превосходящее увеличение активности выключения генов.

Соответственно, изобретение относится к средствам из двухцепочечной РНКи, способным к ингибированию экспрессии целевого гена (т. е., гена ангиотензиногена (AGT)) *in vivo*. РНКи средство содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь. Каждая цепь РНКи средства может находиться в диапазоне 12-30 нуклеотидов в длину. Например, каждая цепь может составлять 14-30 нуклеотидов в длину, 17-30 нуклеотидов в длину, 25-30 нуклеотидов в длину, 27-30 нуклеотидов в длину, 17-23 нуклеотидов в длину, 17-21 нуклеотидов в длину, 17-19 нуклеотидов в длину, 19-25 нуклеотидов в длину, 19-23 нуклеотидов в длину, 19-21 нуклеотидов в длину, 21-25 нуклеотидов в длину или 21-23 нуклеотида в длину.

Смысловая цепь и антисмысловая цепь типично образуют дуплексную двухцепочечную РНК («дцРНК»), также обозначаемую в настоящем документе как «РНКи средство». Дуплексная область РНКи средства может составлять 12-30 нуклеотидных пар в длину. Например, дуплексная область может составлять 14-30 нуклеотидных пар в длину, 17-30 нуклеотидных пар в длину, 27-30 нуклеотидных пар в длину, 17-23 нуклеотидных пары в длину, 17-21 нуклеотидную пару в длину, 17-19 нуклеотидных пар в длину, 19-25 нуклеотидных пар в длину, 19-23 нуклеотидных пары в длину, 19-21 нуклеотидную пару в длину, 21-25 нуклеотидных пар в длину или 21-23 нуклеотидных пары в длину. В другом примере, дуплексную область выбирают из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 нуклеотидов в длину.

В одном из вариантов осуществления РНКи средство может содержать одну или несколько областей выступов и/или блокирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах одной или обеих цепей. Выступ может составлять 1-6 нуклеотидов в длину, например, 2-6 нуклеотидов в длину, 1-5 нуклеотидов в длину, 2-5 нуклеотидов в длину, 1-4 нуклеотида в длину, 2-4 нуклеотида в длину, 1-3 нуклеотида в длину, 2-3 нуклеотида в длину или 1-2 нуклеотида в длину. Выступы могут представлять собой результат

того, что одна цепь длиннее, чем другая, или результат того, что две цепи одной длины смещены друг относительно друга. Выступ может образовывать несовпадение с целевой мРНК или он может быть комплементарен последовательностям генов, на которые направлено воздействие, или могут представлять собой другую последовательность. Как рассмотрено в настоящем документе, увеличенный выступ вплоть до 30 нуклеотидов в длину также предусмотрен в различных вариантах осуществления изобретения. Первая и вторая цепи также могут быть соединены, например, с помощью дополнительных оснований для того, чтобы формировать шпильку, или с помощью других линкеров не из оснований.

В одном из вариантов осуществления каждый нуклеотид в области выступа в РНКи средство может независимо представлять собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, включая, но без ограничения, модифицированный 2'-сахар, например, 2-F, 2'-O-метил, тимидин (Т), 2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин (Тео), 2'-O-метоксиэтиладенозин (Аео), 2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин (m5Сео) и какие-либо их сочетания. Например, ТТ может представлять собой последовательность выступа для любого конца на любой цепи. Выступ может формировать несовпадение с целевой мРНК или он может быть комплементарен последовательностям генов, на которые оказывают направленное воздействие, или может представлять собой другую последовательность.

5'- или 3'-выступы на смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепях РНКи средства могут быть фосфорилированы. В некоторых вариантах осуществления область (области) выступа содержит два нуклеотида, имеющие фосфориоат между двумя нуклеотидами, где два нуклеотида могут представлять собой одно и то же или различное. В одном из вариантов осуществления выступ присутствует на 3'-конце смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепей. В одном из вариантов осуществления этот 3'-выступ присутствует в антисмысловой цепи. В одном из вариантов осуществления этот 3'-выступ присутствует в смысловой цепи.

РНКи средство может содержать только один выступ, который

может усиливать активность интерференции РНКи, не воздействуя на ее стабильность в целом. Например, одноцепочечный выступ может быть расположен на 3'-конце смысловой цепи или, альтернативно, на 3'-конце антисмысловой цепи. РНКи также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой цепи (или 3'-конец смысловой цепи) или наоборот. В целом, антисмысловая цепь РНКи имеет выступающий нуклеотид на 3'-конце, а 5'-конец является тупым. Не желая ограничиваться теорией, асимметричный тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи и 3'-концевой выступ антисмысловой цепи благоприятствуют загрузке направляющей цепи в RISC процесс.

В одном из вариантов осуществления РНКи средство представляет собой структуру с двумя тупыми концами в 19 нуклеотидов в длину, в которой смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 7, 8, 9 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-O-метил в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В другом варианте осуществления РНКи средство представляет собой структуру с двумя тупыми концами в 20 нуклеотидов в длину, в которой смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 8, 9, 10 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-O-метил в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В еще одном другом варианте осуществления РНКи средство представляет собой структуру с двумя тупыми концами в 21 нуклеотид в длину, в которой смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-O-метил в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12,

13 от 5'-конца.

В одном из вариантов осуществления РНКи средство содержит смысловую цепь в 21 нуклеотид и антисмысловую цепь в 23 нуклеотида, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца; антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-O-метил в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца, где один конец РНКи средства является тупым, тогда как другой конец содержит 2 выступающих нуклеотида. Предпочтительно, 2 выступающих нуклеотида находятся на 3'-конце антисмысловой цепи.

Когда 2 выступающих нуклеотида находятся на 3'-конце антисмысловой цепи, могут иметь место две фосфориоатных межнуклеотидных связи между тремя концевыми нуклеотидами, где два из трех нуклеотидов представляют собой выступающие нуклеотиды и третий нуклеотид представляет собой спаренный нуклеотид рядом с выступающим нуклеотидом. В одном из вариантов осуществления РНКи средство дополнительно имеет две фосфориоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5'-конце смысловой цепи, так и на 5'-конце антисмысловой цепи. В одном из вариантов осуществления каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи РНКи средства, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов, представляют собой модифицированные нуклеотиды. В одном из вариантов осуществления каждый остаток независимо модифицирован с использованием 2'-O-метила или 3'-фтора, например, в чередующемся мотиве. Необязательно, РНКи средство дополнительно содержит лиганд (предпочтительно GalNAc3).

В одном из вариантов осуществления РНКи средство содержит смысловую и антисмысловую цепь, где смысловая цепь составляет 25-30 нуклеотидных остатков в длину, где, начиная с 5'-концевого нуклеотида (положение 1), положения с 1 до 23 первой цепи содержат по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; антисмысловая цепь

составляет 36-66 нуклеотидных остатков в длину и, начиная с 3'-концевого нуклеотида, содержит по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, образующих пары с положениями 1-23 смысловой цепи, чтобы формировать дуплекс; где по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой цепи не спарен со смысловой цепью и вплоть до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов не спарены со смысловой цепью, тем самым, формируя 3'-одноцепочечный выступ из 1-6 нуклеотидов; где 5'-конец антисмысловой цепи содержит 10-30 последовательных нуклеотидов, которые не спарены со смысловой цепью, тем самым образуя одноцепочечный 5'-выступ из 10-30 нуклеотидов; где по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой цепи образуют пары оснований с нуклеотидами антисмысловой цепи, когда смысловую и антисмысловую цепи выравнивают для максимальной комплементарности, тем самым формируя по существу дуплексную область между смысловой и антисмысловой цепями; и антисмысловая цепь достаточно комплементарна целевой РНК на протяжении отрезка антисмысловой цепи по меньшей мере в 19 рибонуклеотидов для того, чтобы снижать экспрессию гена-мишени, когда двухцепочечную нуклеиновую кислоту вводят в клетку млекопитающего; и где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов встречается в или около сайта расщепления. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-O-метил в трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления или около него.

В одном из вариантов осуществления РНКи средство содержит смысловую и антисмысловую цепи, где РНКи средство содержит первую цепь, имеющую длину, которая составляет по меньшей мере 25 и самое большее 29 нуклеотидов, и вторую цепь, имеющую длину, которая составляет самое большее 30 нуклеотидов, с по меньшей мере одним мотивом из трех модификаций 2'-O-метил в трех последовательных нуклеотидах в положении 11, 12, 13 от 5'-конца; где 3'-конец первой цепи и 5'-конец второй цепи формируют тупой

конец и вторая цепь на 1-4 нуклеотида длиннее на ее 3'-конце, чем первая цепь, где дуплексная область, которая составляет по меньшей мере 25 нуклеотидов в длину, и вторая цепь достаточно комплементарна целевой мРНК на протяжении отрезка второй цепи по меньшей мере в 19 нуклеотидов для того, чтобы снижать экспрессию гена-мишени, когда РНКи средство вводят в клетку млекопитающего, и где расщепление РНКи средства дайсером предпочтительно ведет к миРНК, которая содержит 3'-конец второй цепи, тем самым снижая экспрессию целевого гена у млекопитающего. Необязательно РНКи средство дополнительно содержит лиганд.

В одном из вариантов осуществления смысловая цепь РНКи средства содержит по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где один из мотивов встречается в сайте расщепления в смысловой цепи.

В одном из вариантов осуществления антисмысловая цепь РНКи средства также может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где один из мотивов встречается в или около сайта расщепления в антисмысловой цепи.

Для РНКи средства, имеющего дуплексную область 17-23 нуклеотида в длину, сайт расщепления антисмысловой цепи типично находится приблизительно в 10, 11 и 12 положениях от 5'-конца. Таким образом, мотивы из трех идентичных модификаций могут встречаться в 9, 10, 11 положениях; 10, 11, 12 положениях; 11, 12, 13 положениях; 12, 13, 14 положениях; или 13, 14, 15 положениях антисмысловой цепи, если считать, начиная от 1-го нуклеотида от 5'-конца антисмысловой цепи, или считать, начиная от 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца антисмысловой цепи. Сайт расщепления в антисмысловой цепи также можно менять в соответствии с длиной дуплексной области РНКи от 5'-конца.

Смысловая цепь РНКи средства может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления цепи; и антисмысловая цепь может иметь по меньшей мере один мотив из

трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления цепи или около него. Когда смысловая цепь и антисмысловая цепь образуют дцРНК дуплекс, смысловую цепь и антисмысловую цепь можно выравнивать так, что один мотив из трех нуклеотидов на смысловой цепи и один мотив из трех нуклеотидов на антисмысловой цепи имеет перекрытие по меньшей мере в один нуклеотид, т. е. по меньшей мере один из трех нуклеотидов мотива в смысловой цепи образует пару оснований с по меньшей мере одним из трех нуклеотидов мотива в антисмысловой цепи. Альтернативно, могут перекрываться по меньшей мере два нуклеотиды или могут перекрываться все три нуклеотида.

В одном из вариантов осуществления смысловая цепь РНКи средства может содержать больше чем один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах. Первый мотив может встречаться в сайте расщепления цепи или около него и другие мотивы могут представлять собой фланкирующую модификацию. Термин «фланкирующая модификация» в настоящем документе относится к мотиву, встречающемуся в другой части цепи, которая отделена от мотива в сайте расщепления той же цепи или около него. Фланкирующая модификация или смежна с первым мотивом или отделена по меньшей мере одним или несколькими нуклеотидами. Когда мотивы являются непосредственно смежными друг с другом, химические свойства мотивов отличаются друг от друга, и, когда мотивы разделены одним или несколькими нуклеотидами, химические свойства могут представлять собой одно и то же или различное. Могут присутствовать две или более фланкирующих модификации. Например, когда две присутствуют фланкирующих модификации, каждая фланкирующая модификация может встречаться на одном конце относительно первого мотива, который находится в сайте расщепления или около него, или по любую сторону от ведущего мотива.

Подобно смысловой цепи, антисмысловая цепь РНКи средства может содержать больше чем один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, причем по меньшей мере один из мотивов встречается в сайте расщепления цепи или около него. Эта антисмысловая цепь также может содержать

одну или несколько фланкирующих модификаций в выравнивании, схожих с фланкирующими модификациями, которые могут присутствовать на смысловой цепи.

В одном из вариантов осуществления фланкирующая модификация на смысловой цепи или антисмысловой цепи РНК средства типично не включает первые один или два концевых нуклеотида на 3'-конце, 5'-конец или обоих концах цепи.

В другом варианте осуществления фланкирующая модификация на смысловой цепи или антисмысловой цепи РНК средства типично не включает первые один или два спаренных нуклеотида в дуплексной области на 3'-конце, 5'-конец или обоих концах цепи.

Когда каждая из смысловой цепи и антисмысловой цепи РНК средства содержит по меньшей мере одну фланкирующую модификацию, фланкирующие модификации могут попадать на тот же конец дуплексной области и иметь перекрытие в один, два или три нуклеотида.

Когда каждая из смысловой цепи и антисмысловой цепи РНК средства содержит по меньшей мере две фланкирующих модификации, смысловую цепь и антисмысловую цепь можно выравнивать так, что две модификации, каждая из одной цепи, попадают на один конец дуплексной области, имея перекрытие в один, два или три нуклеотида; две модификации, каждая из одной цепи, попадают на другой конец дуплексной области, имея перекрытие в один, два или три нуклеотида; две модификации одной цепи попадают на каждую сторону ведущего мотива, имея перекрытие в один, два или три нуклеотида в дуплексной области.

В одном из вариантов осуществления можно модифицировать каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи РНК средства, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов. Каждый нуклеотид можно модифицировать с использованием одной и той же или отличающейся модификации, что может включать одно или несколько изменений одного или обоих несоединяющих кислородов фосфата и/или одного или нескольких соединяющих кислородов фосфата; изменение составляющей сахара рибозы, например, 2'-гидроксила на сахаре рибозе; массовую замену фосфатного

фрагмента на «дефосфо» линкеры; модификацию или замену основания, встречающегося в природе; и замену или модификацию рибозофосфатного остова.

Поскольку нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры из звеньев, многие модификации встречаются в положении, которое повторяется в нуклеиновой кислоте, например, модификация основания или фосфатного фрагмента или несоединяющий O фосфатного фрагмента. В некоторых случаях модификация будет встречаться во всех рассматриваемых положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях это не будет так. В качестве примера, модификация может встречаться только в 3'- или 5'-концевом положении, может встречаться только в концевой области, например, в положении на концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи. Модификация может встречаться в области двойной цепи, области одинарной цепи или и там и там. Модификация может встречаться только в области двойной цепи РНК или может встречаться только в области одинарной цепи РНК. Например, фосфортиоатная модификация в положении несоединяющего O может встречаться только на одном или обоих концах, может встречаться только в концевой области, например, в положении на концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи или может встречаться в областях двойной цепи или одинарной цепи, в частности, на концах. 5'-конец или -концы могут быть фосфорилированы.

Может быть возможно, например, увеличивать стабильность, включать конкретные основания в выступы или включать модифицированные нуклеотиды или нуклеотидными заменителями в выступах одной цепи, например, в 5'- или 3'-выступе, или в обеих. Например, может быть желательно включать пуриновые нуклеотиды в выступы. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые из оснований в 3'- или 5'-выступе можно модифицировать, например, с использованием модификации, описанной в настоящем документе. Модификации могут включать, например, использование модификаций в 2'-положении сахара рибозы с модификациями, которые известны в данной области, например, использование дезоксирибонуклеотидов,

2'-дезоксидеокси-2'-фтор- (2'-F) или 2'-О-метил-модифицированных взамен рибосахара нуклеинового основания, и модификации в фосфатной группе, например, фосфоротионатные модификации. Выступы не обязательно гомологичны целевой последовательности.

В одном из вариантов осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован с использованием LNA, CRN, cET, UNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-метила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-дезоксидеокси, 2'-гидроксила или 2'-фтора. Цепи могут содержать больше чем одну модификацию. В одном из вариантов осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором.

По меньшей мере две различных модификации типично присутствуют в смысловой цепи и антисмысловой цепи. Эти две модификации могут представлять собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации или другие.

В одном из вариантов осуществления N_a и/или N_b содержит модификации чередующегося паттерна. Термин «чередующийся мотив», как используют в настоящем документе относится к мотиву, имеющему одну или несколько модификаций, каждая модификация встречается на чередующихся нуклеотидах одной цепи. Чередующийся нуклеотид может относиться к одному нуклеотиду, приходящемуся на каждый второй нуклеотид, или к одному нуклеотиду, приходящемуся на каждые три нуклеотида, или к схожему паттерну. Например, если каждое из А, В и С представляет модификацию нуклеотида одного типа, чередующийся мотив может представлять собой «АВАВАВАВАВАВ...», «ААВВААВВААВВ...», «ААВААВААВААВ...», «АААВАААВАААВ...», «АААВВВАААВВВ...» или «АВСАВСАВСАВС...» и т. д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одним и тем же или отличающимся. Например, если каждое из А, В, С, D представляет один тип модификации нуклеотида, чередующийся паттерн, т. е., модификации в каждом втором нуклеотиде, может представлять собой одно и то же, но для каждой из смысловой цепи или антисмысловой цепи можно выбрать из нескольких возможных модификаций в чередующемся мотиве, таком

как «АВАВАВ...», «АСАСАС...» «ВДВДВД...» или «СДСДСД...», и т. д.

В одном из вариантов осуществления РНКи средство по изобретению содержит модификационный паттерн для чередующегося мотива на смысловой цепи относительно модификационного паттерна для чередующегося мотива на антисмысловая цепь сдвинут. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой цепи соответствует иначе модифицированной группе нуклеотидов антисмысловой цепи и наоборот. Например, смысловая цепь при спаривании с антисмысловой цепью в дцРНК дуплексе, чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «АВАВАВ» от 5'-3' цепи и чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «ВАВАВА» от 5'-3'цепи внутри дуплексной области. В качестве другого примера, чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «ААВВААВВ» от 5'-3' цепи и чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «ВВААВВАА» от 5'-3' цепи в дуплексной области, чтобы имел место полный или частичный сдвиг модификационных паттернов между смысловой цепью и антисмысловой цепью.

В одном из вариантов осуществления РНКи средство содержит паттерн чередующегося мотива из 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации на смысловой цепи изначально имеет сдвиг относительно паттерна чередующегося мотива из 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации на антисмысловой цепи изначально, т. е., 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид на парах оснований смысловой цепи с 2'-F-модифицированным нуклеотидом на антисмысловой цепи и наоборот. Положение 1 смысловой цепи может начинаться с 2'-F-модификации и положение 1 антисмысловой цепи может начинаться с 2'-О-метил-модификации.

Введение одного или нескольких мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в смысловую цепь и/или антисмысловую цепь нарушает начальный модификационный паттерн, присутствующий в смысловой цепи и/или антисмысловой цепи. Это нарушение модификационного паттерна смысловой и/или антисмысловой цепи посредством введения одного или нескольких

мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в смысловую и/или антисмысловую цепь, к удивлению, увеличивает активность выключения генов для целевого гена.

В одном из вариантов осуществления, когда мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах вводят в какую-либо из цепей, модификация нуклеотида рядом с мотивом представляет собой модификацию, отличающуюся от модификации мотива. Например, часть последовательности, содержащей мотив, представляет собой «...N_aY₁Y₂N_b...», где «Y» представляет модификацию мотива из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, и «N_a» и «N_b» представляют модификацию в нуклеотиде рядом с мотивом «Y₁Y₂Y₃», которая отличается от модификации Y, и где N_a и N_b могут представлять собой одинаковые или различающиеся модификации. Альтернативно N_a и/или N_b может присутствовать или отсутствовать, когда присутствует фланкирующая модификация.

РНКи средство дополнительно может содержать по меньшей мере одну фосфориоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Фосфориоатная или метилфосфонатная модификация межнуклеотидной связи может встречаться на любом нуклеотиде смысловой цепи или антисмысловой цепи или обеих цепей в любом положении в цепи. Например, модификация межнуклеотидной связи может встречаться на каждом нуклеотиде на смысловой цепи и/или антисмысловой цепи; каждая модификация межнуклеотидной связи может встречаться в чередующемся паттерне на смысловой цепи и/или антисмысловой цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь может содержать обе модификации межнуклеотидной связи в чередующемся паттерне. Чередующийся паттерн модификаций межнуклеотидной связи на смысловой цепи может представлять собой то же самое или отличное от антисмысловой цепи и чередующийся паттерн модификаций межнуклеотидной связи на смысловой цепи может иметь сдвиг относительно чередующегося паттерна модификаций межнуклеотидной связи на антисмысловой цепи. В одном из вариантов осуществления средство из двухцепочечной РНКи содержит 6–8 фосфориоатных межнуклеотидных связей. В одном из вариантов осуществления

антисмысловая цепь содержит две фосфориоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфориоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, а смысловая цепь содержит по меньшей мере две фосфориоатных межнуклеотидных связи на 5'-конце или 3'-конце.

В одном из вариантов осуществления РНКи содержит фосфориоатную или метилфосфонатную модификацию межнуклеотидной связи в области выступа. Например, область выступа может содержать два нуклеотида, имеющих фосфориоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь между двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также можно создавать для того, чтобы соединять выступающие нуклеотиды с концевыми спаренными нуклеотидами внутри дуплексной области. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все выступающие нуклеотиды можно соединять через фосфориоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь и необязательно могут иметь место дополнительные фосфориоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, соединяющие выступающий нуклеотид со спаренным нуклеотидом, который находится рядом с выступающим нуклеотидом. Например, могут иметь место по меньшей мере две фосфориоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами, где два из трех нуклеотидов представляют собой выступающие нуклеотиды, а третий представляет собой спаренный нуклеотид рядом с выступающим нуклеотидом. Эти три концевых нуклеотида могут находиться на 3'-конце антисмысловой цепи, 3'-конце смысловой цепи, 5'-конце антисмысловой цепи и/или 5'-конце антисмысловой цепи.

В одном из вариантов осуществления 2 выступающих нуклеотида находятся на 3'-конце антисмысловой цепи и имеют место две фосфориоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами, в которых два из трех нуклеотидов представляют собой выступающий нуклеотиды, а третий нуклеотид представляет собой спаренный нуклеотид рядом с выступающим нуклеотидом. Необязательно, РНКи средство дополнительно может иметь две фосфориоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5'-конце смысловой цепи, так и на 5'-конце

антисмысловой цепи.

В одном из вариантов осуществления РНКи средство содержит несовпадение (несовпадения) с мишенью, внутри дуплекса, или их сочетания. Несовпадение может встречаться в области выступа или дуплексной области. Пару оснований можно ранжировать на основании их предрасположенности содействовать диссоциации или плавлению (например, по свободной энергии ассоциации или диссоциации конкретной пары, самый простой подход состоит в исследовании пар на основе отдельных пар, хотя также можно использовать ближнего соседа или схожий анализ). В отношении содействия диссоциации: А:U предпочтительнее, чем G:C; G:U предпочтительнее чем G:C; и I:C предпочтительнее чем G:C (I=инозин). Несовпадения, например, неканонические пары или пары, отличные от канонических, (как описано в другом месте в настоящем документе) являются предпочтительнее, чем канонические (А:Т, А:U, G:C) пары; и пары, которые содержат универсальное основание, являются более предпочтительными, чем канонические пары.

В одном из вариантов осуществления РНКи средство содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в областях дуплексов от 5'-конца антисмысловой цепи, независимо выбранных из группы из: А:U, G:U, I:C и пар с несовпадениями, например, неканонических пар или пар, отличных от канонических, или пар, которые содержат универсальное основание, чтобы содействовать диссоциации антисмысловой цепи на 5'-конце дуплекса.

В одном из вариантов осуществления нуклеотид в положении 1 в дуплексной области от 5'-конца в антисмысловой цепи выбирают из группы, состоящей из А, dА, dU, U и dТ. Альтернативно, по меньшей мере одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований в дуплексной области от 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU. Например, первая пара оснований в дуплексной области от 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU.

В другом варианте осуществления нуклеотид на 3'-конце

смысловой цепи представляет собой дезокситимин (dT). В другом варианте осуществления нуклеотид на 3'-конце антисмысловой цепи представляет собой дезокситимин (dT). В одном из вариантов осуществления имеет место короткая последовательность из нуклеотида дезокситимин, например, из двух нуклеотидов dT на 3'-конце смысловой и/или антисмысловой цепи.

В одном из вариантов осуществления последовательность смысловой цепи можно представить с помощью формулы (I):



где:

i и j каждое независимо представляет собой 0 или 1;

p и q каждое независимо равно 0-6;

каждое N_a независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-25 модифицированных нуклеотидов, каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

каждое N_b независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-10 модифицированных нуклеотиды;

каждое n_p и n_q независимо представляет выступающий нуклеотид;

где N_b и Y не имеют одну и ту же модификацию; и

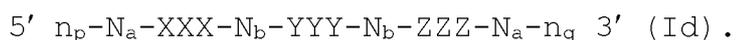
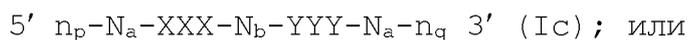
XXX , $Y\text{Y}\text{Y}$ и ZZZ каждое независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах. Предпочтительно $Y\text{Y}\text{Y}$ представляет собой все 2'-F-модифицированные нуклеотиды.

В одном из вариантов осуществления N_a и/или N_b содержит модификации чередующегося паттерна.

В одном из вариантов осуществления мотив $Y\text{Y}\text{Y}$ встречается в или около сайта расщепления смысловой цепи. Например, когда РНКи средство имеет дуплексную область 17-23 нуклеотида в длину, мотив $Y\text{Y}\text{Y}$ может встречаться в сайте расщепления или вблизи от него (например: может встречаться в положениях 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 или 11, 12, 13) - смысловой цепи, если считать, начиная с 1-го нуклеотида, от 5'-конца; или

необязательно, если считать, начиная с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области, от 5'-конца.

В одном из вариантов осуществления i равно 1 и j равно 0 или i равно 0 и j равно 1 или как i , так и j равно 1. Следовательно, смысловую цепь можно представить с помощью следующих формул:

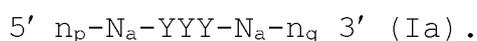


Когда смысловая цепь представлена формулой (Ib), N_b представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждое N_a может независимо представлять олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда смысловую цепь представляют формулой (Ic), N_b представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждое N_a может независимо представлять олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда смысловую цепь представляют формулой (Id), каждое N_b независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно, N_b равно 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, Каждое N_a может независимо представлять олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждое X, Y и Z может представлять собой одно и то же или отличающееся друг от друга.

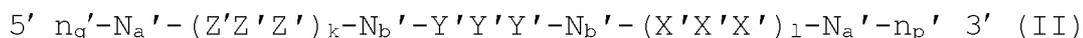
В других вариантах осуществления i равно 0 и j равно 0 и смысловую цепь можно представить формулой:



Когда смысловая цепь представлена формулой (Ia), каждое N_a может независимо представлять олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 2-20, 2-15 или 2-10

модифицированных нуклеотидов.

В одном из вариантов осуществления последовательность антисмысловой цепи РНКи можно представить формулой (II):



где:

k и l каждое независимо представляет собой 0 или 1;

p' и q' каждое независимо равно 0-6;

каждое N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-25 модифицированных нуклеотидов, каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

каждое N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-10 модифицированных нуклеотидов;

каждое n_p' и n_q' независимо представляет выступающий нуклеотид;

где N_b' и Y' не имеют одну и ту же модификацию; и

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

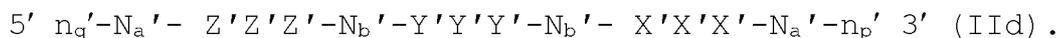
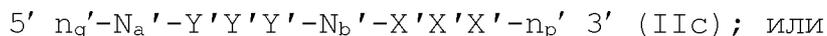
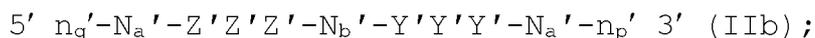
В одном из вариантов осуществления N_a' и/или N_b' содержит модификации чередующегося паттерна.

Мотив $Y'Y'Y'$ встречается в или около сайта расщепления антисмысловой цепи. Например, когда РНКи средство имеет дуплексную область из 17-23 нуклеотидов в длину, мотив $Y'Y'Y'$ может встречаться в положениях 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; или 13, 14, 15 антисмысловой цепи, если считать, начиная от 1-го нуклеотида, от 5'-конца; или необязательно, если считать, начиная с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области, от 5'-конца. Предпочтительно, мотив $Y'Y'Y'$ встречается в положениях 11, 12, 13.

В одном из вариантов осуществления мотив $Y'Y'Y'$ представляет собой все 2'-ОМе-модифицированные нуклеотиды.

В одном из вариантов осуществления k равно 1 и l равно 0 или k равно 0 и l равно 1 или как k, так и l равно 1.

Следовательно, антисмысловую цепь можно представлять следующими формулами:

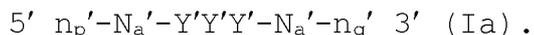


Когда антисмысловая цепь представлена формулой (IIb), N_b' представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждое N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 2-20, 2-15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

Когда антисмысловую цепь представляют формулой (IIc), N_b' представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждое N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда антисмысловую цепь представляют формулой (IId), каждое N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждое N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно N_b равно 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В других вариантах осуществления k равно 0 и l равно 0 и антисмысловую цепь можно представить формулой:



Когда антисмысловую цепь представляют формулой (IIa), каждое N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Каждое X' , Y' и Z' может представлять собой одинаковое или отличающееся друг от друга.

Каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи может

быть независимо модифицированным с использованием LNA, CRN, UNA, cEt, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-O-метила, 2'-O-аллила, 2'-C-аллила, 2'-гидроксила или 2'-фтора. Например, каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицируют с использованием 2'-O-метила или 2'-фтора. Каждый X, Y, Z, X', Y' и Z', в частности, может представлять 2'-O-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию.

В одном из вариантов осуществления смысловая цепь РНКи средства может содержать мотив YYY, встречающийся в 9, 10 и 11 положениях цепи, когда дуплексная область составляет 21 нуклеотид, если считать, начиная с 1-го нуклеотида от 5'-конца, или, необязательно, если считать, начиная с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области, от 5'-конца; и Y представляет 2'-F-модификацию. Смысловая цепь может дополнительно содержать мотив или мотивы ZZZ в качестве фланкирующих модификаций на противоположном конце дуплексной области; и XXX и ZZZ каждое независимо представляет 2'-OMe-модификацию или 2'-F-модификацию.

В одном из вариантов осуществления антисмысловая цепь может содержать мотив Y'Y'Y', встречающийся в положениях 11, 12, 13 цепи, если начинать считать с 1-го нуклеотида от 5'-конца, или, необязательно, если начинать считать с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области, от 5'-конца; и Y' представляет 2'-O-метил-модификацию. Антисмысловая цепь может дополнительно содержать мотив X'X'X' или мотивы Z'Z'Z' в качестве фланкирующих модификаций на противоположном конце дуплексной области; и X'X'X' и Z'Z'Z' каждый независимо представляет 2'-OMe-модификацию или 2'-F-модификацию.

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

Соответственно, РНКи средства для использования в способах по изобретению могут содержать смысловую цепь и антисмысловую цепь, каждая цепь имеет от 14 до 30 нуклеотидов, РНКи дуплекс

представлен формулой (III):

смысловая: $5' n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q 3'$

антисмысловая: $3' n_{p'}-N_{a'}-(X'X'X')_k-N_{b'}-Y'Y'Y'-N_{b'}-(Z'Z'Z')_l-N_{a'}-n_{q'} 5'$

(III)

где:

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

p , p' , q и q' каждое независимо равно 0-6;

каждое N_a и $N_{a'}$ независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-25 модифицированных нуклеотидов, каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

каждое N_b и $N_{b'}$ независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-10 модифицированных нуклеотидов;

где каждое $n_{p'}$, n_p , $n_{q'}$ и n_q , каждое из которых может присутствовать или может не присутствовать, независимо представляет выступающий нуклеотид; и

каждое из XXX , YYY , ZZZ , $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ и $Z'Z'Z'$ независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах.

В одном из вариантов осуществления i равно 0 и j равно 0; или i равно 1 и j равно 0; или i равно 0 и j равно 1; или как i , так и j равно 0; или как i , так и j равно 1. В другом варианте осуществления k равно 0 и l равно 0; или k равно 1 и l равно 0; k равно 0 и l равно 1; или как k , так и l равно 0; или как k , так и l равно 1.

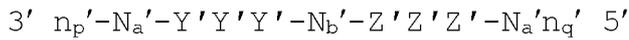
Образцовые комбинации смысловой цепи и антисмысловой цепи, образующих РНКи дуплекс, включают следующие формулы:

$5' n_p-N_a-YYY-N_a-n_q 3'$

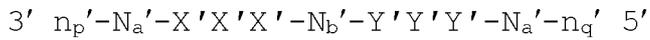
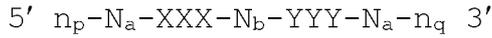
$3' n_{p'}-N_{a'}-Y'Y'Y'-N_{a'}n_{q'} 5'$

(IIIa)

$5' n_p-N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3'$



(IIIb)



(IIIc)



(IIId)

Когда РНКи средство представлено формулой (IIIa), каждое N_a независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда РНКи средство представлено формулой (IIIb), каждое N_b независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 1-10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотида. Каждое N_a независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда РНКи средство представляют формулой (IIIc), каждое N_b , N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждое N_a независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда РНКи средство представляют формулой (IIId), каждое N_b , N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждое N_a , N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, которая содержит 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждое из N_a , N_a' , N_b и N_b' независимо содержит модификации чередующегося паттерна.

Каждое из X, Y и Z в формулах (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId) может представлять собой одно и то же или отличающееся

друг от друга.

Когда РНКи средство представлено формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), по меньшей мере один из Y нуклеотидов может образовывать пару оснований с одним из Y' нуклеотидов. Альтернативно, по меньшей мере два из Y нуклеотидов образуют пары оснований с соответствующими Y' нуклеотидами; или все три Y нуклеотида формируют пары оснований с соответствующими Y' нуклеотидами.

Когда РНКи средство представлено формулой (IIIb) или (IIId), по меньшей мере один из Z нуклеотидов может образовывать пару оснований с одним из Z' нуклеотидов. Альтернативно, по меньшей мере два из Z нуклеотидов образуют пары оснований с соответствующими Z' нуклеотидами; или все три Z нуклеотида образуют пары оснований с соответствующими Z' нуклеотидами.

Когда РНКи средство представляют формулой (IIIc) или (IIId), по меньшей мере один из X нуклеотидов может образовывать пару оснований с одним из X' нуклеотидов. Альтернативно, по меньшей мере два из X нуклеотидов образуют пары оснований с соответствующими X' нуклеотидами; или все три X нуклеотида образуют пары оснований с соответствующими X' нуклеотидами.

В одном из вариантов осуществления модификация на Y нуклеотиде отличается от модификации на Y' нуклеотиде, модификация на Z нуклеотиде отличается от модификации на Z' нуклеотиде и/или модификация на X нуклеотиде отличается от модификации на X' нуклеотиде.

В одном из вариантов осуществления, когда РНКи средство представлено формулой (IIId), модификации N_a представляют собой 2'-O-метил- или 2'-фтор-модификации. В другом варианте осуществления, когда РНКи средство представлено формулой (IIId), модификации N_a представляют собой 2'-O-метил- или 2'-фтор-модификации и $n_p' > 0$ и по меньшей мере одно n_p' связано с соседним нуклеотидом через фосфориатную связь. В еще одном другом варианте осуществления, когда РНКи средство представлено формулой (IIId), модификации N_a представляют собой 2'-O-метил- или 2'-фтор-модификации, $n_p' > 0$ и по меньшей мере одно n_p' связано

с соседним нуклеотидом через фосфориоатную связь, а смысловую цепь конъюгируют с одним или несколькими производными GalNAc, прикрепленными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер (описанный далее). В другом варианте осуществления, когда РНКи средство представлено формулой (IIId), модификации N_a представляют собой 2'-O-метил- или 2'-фтор-модификации, $n_p' > 0$ и по меньшей мере одно n_p' связано с соседним нуклеотидом через фосфориоатную связь, смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфориоатную связь и смысловую цепь конъюгируют с одним или несколькими производными GalNAc, прикрепленными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В одном из вариантов осуществления, когда РНКи средство представлено формулой (IIIa), модификации N_a представляют собой 2'-O-метил- или 2'-фтор-модификации, $n_p' > 0$ и по меньшей мере одно n_p' связано с соседним нуклеотидом через фосфориоатную связь, смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфориоатную связь и смысловую цепь конъюгируют с одним или несколькими производными GalNAc, прикрепленными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В одном из вариантов осуществления РНКи средство представляет собой мультимер, который содержит по меньшей мере два дуплекса, представленных формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), где дуплексы соединяют с помощью линкера. Линкер может быть расщепляемым или не расщепляемым. Необязательно, мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может быть направлен на один и тот же ген или на два различных гена; или каждый из дуплексов может быть направлен на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В одном из вариантов осуществления РНКи средство представляет собой мультимер, который содержит три, четыре, пять, шесть или больше дуплексов, представленных формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), где дуплексы соединяют с помощью линкера. Линкер может быть расщепляемым или не расщепляемым. Необязательно, мультимер дополнительно содержит

лиганд. Каждый из дуплексов может быть направлен на один и тот же ген или на два различных гена; или каждый из дуплексов может быть направлен на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В одном из вариантов осуществления два РНКи средства, представленные формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), связаны друг с другом на 5'-конце и одном или обоих 3'-концах и необязательно конъюгированы с лигандом. Каждое из средств может быть направлено на один и тот же ген или на два различных гена; или каждое из средств может быть направлено на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В различных публикациях описаны мультимерные РНКи средства, которые можно использовать в способах по изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, патент США № 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 и WO2011/031520, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Как описано более подробно далее, РНКи средство, которое содержит конъюгаты одной или нескольких молекул углеводов с РНКи средством, позволяет оптимизировать одно или несколько свойств РНКи средства. Во многих случаях, молекула углевода будет прикреплена к модифицированному звену РНКи средства. Например, сахар рибозу в одном или нескольких рибонуклеотидных звеньев в дцРНК средстве можно заменять на другой фрагмент, например, не углеводный (предпочтительно, циклический) носитель, к которому прикрепляют углеводный лиганд. Рибонуклеотидное звено, в котором сахар рибозу из звена заменили таким образом, называют в настоящем документе как звено с модификацией заменой рибозы (RRMS). Циклический носитель может представлять собой карбоциклическую кольцевую систему, т. е., все кольцевые атомы представляют собой атомы углерода, или гетероциклическую кольцевую систему, т. е., один или несколько кольцевых атомов могут представлять собой гетероатом, например, азот, кислород, серу. Циклический носитель может представлять собой моноциклическую кольцевую систему или может содержать два или

более колец, например, конденсированные кольца. Циклический носитель может представлять собой полностью насыщенную кольцевую систему или он может содержать одну или несколько двойных связей.

Лиганд можно прикреплять к полинуклеотиду через носитель. Носители включают (i) по меньшей мере одну «точку прикрепления остова», предпочтительно две «точки прикрепления остова» и (ii) по меньшей мере одну «соединяющую точку прикрепления». «Точка прикрепления остова», как используют в настоящем документе, относится к функциональной группе, например, гидроксильной группе, или в целом к связи, доступной для, и подходящей для встраивания носителя в остов, например, фосфат или модифицированный фосфат, например, содержащий серу, остов, рибонуклеиновой кислоты. «Соединяющая точка прикрепления» (ТАР) в некоторых вариантах осуществления относится к составляющему атому кольца циклического носителя, например, к атому углерода или гетероатому (отличному от атома, который предоставляет точку прикрепления остова), который соединяет выбранный фрагмент. Фрагмент может представлять собой, например, углевод, например, моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид и полисахарид. Необязательно, выбранный фрагмент соединяют посредством промежуточного соединителя к циклическому носителю. Таким образом, циклический носитель часто включает функциональную группу, например, аминогруппу, или в целом предусматривает связь, которая подходит для встраивания или соединения другой химической структуры, например, лиганда, к составляющему кольцу.

РНКи средства можно конъюгировать с лигандом через носитель, где носитель может представлять собой циклическую группу или ациклическую группу; предпочтительно, циклическую группу выбирают из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина; предпочтительно, ациклическую группу выбирают из серинолового остова или диэтаноламинового

остова.

В определенных конкретных вариантах осуществления РНКи средство для использования в способах по изобретению представляет собой средство, выбранное из группы средств, перечисленных в любой одной из таблиц 3, 4, 7, 8, 11, 13 и 15. Эти средства дополнительно могут содержать лиганд.

IV. иРНК, конъюгированные с лигандами

Другая модификация РНК в иРНК по изобретению включает химическое связывание РНК и одного или нескольких лигандов, фрагментов или конъюгатов, которые увеличивают активность, клеточное распределение или клеточное накопление иРНК. Такие фрагменты включают, но не ограничиваясь этим, липидные фрагменты, такие как фрагмент холестерина (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 6553-6556), холевая кислота (Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053-1060), простой тиоэфир, например, борил-S-тримилтиол (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306-309; Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533-538), алифатическая цепь, например, остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10:1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49-54), фосфолипид, например, дигексадецил-рац-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-фосфонат (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777-3783), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969-973), или адамантан-уксусная кислота (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654), пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229-237), или октадециламин или фрагмент гексиламино-карбонилноксихолестерина (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923-937).

В одном из вариантов осуществления лиганд изменяет распределение, направленность или время жизни иРНК средства, в которое его встраивают. В предпочтительных вариантах

осуществления лиганд обеспечивает увеличенную аффинность к выбранной мишени, например, молекуле, клетке или типу клеток, компартменту, например, клеточному или органному компартменту, ткани, органу или области организма, например, по сравнению с частицами, которые не содержат такой лиганд. Предпочтительные лиганды не принимают участия в образовании пар дуплекса в дуплексной нуклеиновой кислоте.

Лиганды могут включать встречающееся в природе вещество, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин, N-ацетилгалактозамин или гиалуроновая кислота); или липид. Лиганд также может представлять собой рекомбинантную или синтетическую молекулу, такую как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминокислота. Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер ангидрида стирол-малеиновой кислоты, сополимер поли(L-лактид-ко-гликолида), сополимер простого дивинилового эфира и maleinowego ангидрида, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламида (HMPA), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), полимеры N-изопропилакриламида или полифосфазин. Примеры полиаминов включают: полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметик полиамин, дендример полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или альфа-спиральный пептид.

Лиганды также могут включать направляющие группы, например, направляющее на клетку или ткань средство, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с конкретным типом клеток, таким как клетка почки. Направляющая группа может представлять собой тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, углевод муцин, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные

полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин B12, витамин A, биотин или пептид RGD или миметик пептида RGD.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), шиватели (например, псорален, митомицин C), порфирины (TPPC4, тексафирин, Sapphyrin), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантан-уксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О-(гексадецил) глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, О3-(олеоил)литохолевую кислоту, О3-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин) и пептидные конъюгаты (например, пептид Antennapedia, пептид Tat), алкилирующие средства, фосфат, амино, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, полиамино, алкил, замещенный алкил, радиоактивно меченные маркеры, ферменты, гаптены (например биотин), средства, облегчающие транспортировку/абсорбцию (например, аспирин, витамин E, фолиевая кислота), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, конъюгаты акридин-имидазол, Eu³⁺ комплексы тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

Лиганды могут представлять собой белки, например, гликопротеины или пептиды, например, молекулы, которые имеют конкретную аффинность к колиганду или антителам, например, антителу, которое связывается с конкретным типом клеток, таким как клетки печени. Лиганды также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Также они могут включать непептидные частицы, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза или поливалентная фукоза. Лиганд может представлять собой, например, липополисахарид, активатор киназы p38 MAP или

активатор NF-κB.

Лиганд может представлять собой вещество, например, лекарственное средство, которое может увеличивать накопление иРНК средства в клетке, например, посредством разрушения цитоскелета клетки, например, посредством разрушения микротрубочек, микрофиламентов и/или промежуточных филаментов клетки. Лекарственное средство может представлять собой, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

В некоторых вариантах осуществления лиганд, прикрепленный к иРНК, как описано в настоящем документе, выполняет функцию фармакокинетического модулятора (ФК модулятора). ФК модуляторы включают липофильные средства, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, средства, связывающиеся с белками, PEG, витамины и т. д. Образцовые ФК модуляторы включают, но не ограничиваясь этим, холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т. д. Также известно, что олигонуклеотиды, которые содержат множество фосфориоатных связей, связываются с белками сыворотки, таким образом, короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды из приблизительно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, которые содержат множество фосфориоатных связей в остове, также допустимы в настоящем изобретении в качестве лигандов (например, ФК модулирующие лиганды). Кроме того, аптамеры, которые связывают компоненты сыворотки (например, белки сыворотки), также пригодны для использования в качестве ФК модулирующих лигандов в вариантах осуществления, описанных в настоящем документе.

Конъюгированные с лигандом олигонуклеотиды по изобретению можно синтезировать с помощью олигонуклеотида, который несет боковую реакционноспособную функциональность, такую как та, которую получают от прикрепления связывающей молекулы к олигонуклеотиду (описано далее). Этот реакционноспособный

олигонуклеотид может вступать в реакцию непосредственно с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезируют несущими любую из множества защитных групп, или лигандами, которые имеют связывающий фрагмент, прикрепленный к ним.

Олигонуклеотиды, используемые в конъюгатах по настоящему изобретению, можно удобным и обычным образом получать с использованием общеизвестного способа твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза продают несколько продавцов, включая, например, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Дополнительно или альтернативно для такого синтеза можно использовать любое другое средство, известное в данной области. Также известно об использовании схожих способов для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфоритоаты и алкилированные производные.

В конъюгированных с лигандом олигонуклеотидах и связанных с конкретной последовательностью нуклеозидов, несущих молекулу лиганда, по настоящему изобретению олигонуклеотиды и олигонуклеозиды можно собирать на подходящем ДНК-синтезаторе с использованием стандартных предшественников нуклеотидов или нуклеозидов или предшественников конъюгатов нуклеотидов или нуклеозидов, которые уже несут связывающий фрагмент, предшественников лиганда-нуклеотида или нуклеозида-конъюгата, которые уже несут молекулу лиганда, или ненуклеозидных строительных блоков, несущих лиганды.

При использовании предшественников нуклеотидов-конъюгатов, которые уже несут связывающий фрагмент, типично выполняют синтез связанных нуклеозидов со специфичностью к последовательности и затем проводят реакцию молекулы лиганда со связывающим фрагментом для того, чтобы формировать конъюгированный с лигандом олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды или связанные нуклеозиды по настоящему изобретению синтезируют с помощью автоматизированного синтезатора, используя фосфорамидиты, получаемые из конъюгатов лиганд-нуклеозид, в дополнение к стандартным фосфорамидитам и нестандартным фосфорамидитам, которые коммерчески доступны и обычно используются в синтезе олигонуклеотидов.

А. Липидные конъюгаты

В одном из вариантов осуществления лиганд или конъюгат представляет собой липид или молекулу на липидной основе. Такой липид или молекула на липидной основе предпочтительно связывает белки сыворотки, например, сывороточный альбумин человека (HSA). HSA-связывающий лиганд делает возможным распределение конъюгата в целевой ткани, например, в целевой не почечной ткани организма. Например, целевая ткань может представлять собой печень, включая паренхимальные клетки печени. Другие молекулы, которые могут связывать HSA, также можно использовать в качестве лигандов. Например, можно использовать напроксен или аспирин. Липид или лиганд на липидной основе может (a) увеличивать устойчивость к деградации конъюгата, (b) увеличивать направленное воздействие или транспортировку в целевую клетку или клеточную мембрану и/или (c) быть использован для того, чтобы корректировать связывание с белками сыворотки, например, HSA.

Лиганд на липидной основе можно использовать для того, чтобы ингибировать, например, контролировать связывание конъюгата с целевой тканью. Например, липид или лиганд на липидной основе, который связывается с HSA более сильно, будет с меньшей вероятностью направлен в почку и, следовательно, будет с меньшей вероятностью выводиться из организма. Липид или лиганд на липидной основе, который связывается с HSA менее сильно, можно использовать для того, чтобы направлять конъюгат в почку.

В предпочтительном варианте осуществления лиганд на липидной основе связывает HSA. Предпочтительно, он связывает HSA с достаточной аффинностью, так что конъюгат предпочтительно будет распределяться в непочечной ткани. Однако предпочтительно, чтобы аффинность не была настолько высокой, чтобы связывание HSA-лиганда не могло быть обратимым.

В другом предпочтительном варианте осуществления лиганд на липидной основе связывает HSA слабо или не связывает вовсе, так что конъюгат предпочтительно будет распределяться в почке. Другие фрагменты, которые направляют в клетки почки, также можно использовать вместо лиганда на липидной основе или в дополнение

к нему.

В другом аспекте лиганд представляет собой фрагмент, например, витамин, который захватывает целевая клетка, например, пролиферирующая клетка. Это особенно эффективно для лечения нарушений, отличающихся нежелательной клеточной пролиферацией, например, озлокачествленного или не озлокачествленного типа, например, клеток злокачественной опухоли. Образцовые витамины включают витамин А, Е и К. Другие образцовые витамины включают витамины В, например, фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль, или другие витамины или питательные вещества, захватываемые целевыми клетками, такими как клетки печени. Также включены HSA и липопротеин низкой плотности (LDL).

В. Проникающие в клетку средства

В другом аспекте лиганд представляет собой проникающее в клетку средство, предпочтительно спиральное проникающее в клетку средство. Предпочтительно, средство является амфипатическим. Образцовое средство представляет собой пептид, такой как Tat или Antennapedia. Если средство представляет собой пептид, его можно модифицировать, включая пептидилмиметические, инвертомерные, не пептидные или псевдопептидные связи, и использовать D-аминокислоты. Спиральное средство предпочтительно представляет собой альфа-спиральное средство, которое предпочтительно имеет липофильную и липофобную фазу.

Лиганд может представлять собой пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также обозначаемый в настоящем документе как олигопептидомиметик) представляет собой молекулу, способную укладываться в определенную трехмерную структуру, схожую с природным пептидом. Прикрепление пептида и пептидомиметиков к иРНК средствам может влиять на фармакокинетическое распределение иРНК, например, посредством усиления распознавания и абсорбции клетками. Пептидный или пептидомиметический фрагмент может составлять приблизительно 5-50 аминокислот в длину, например, приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот в длину.

Пептид или пептидомиметик может представлять собой, например, проникающий в клетку пептид, катионный пептид,

амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий, прежде всего, из Tyr, Trp или Phe). Пептидный фрагмент может представлять собой дендримерный пептид, конформационно затрудненный пептид или сшитый пептид. В другой альтернативе пептидный фрагмент может содержать гидрофобную последовательность транслокации в мембране (MTS). Образцовый гидрофобный MTS-содержащий пептид представляет собой RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID № 9). Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID № 10), содержащая гидрофобный MTS, также может представлять собой направляющий фрагмент. Пептидный фрагмент может представлять собой «доставляющий» пептид, который может нести большие полярные молекулы, в том числе пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны. Например, обнаружено, что последовательности из белка Tat HIV (GRKKRRQRRPPQ (SEQ ID № 11) и белка Antennapedia Drosophila (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID № 12) способны выполнять функцию доставляющих пептидов. Пептид или пептидомиметик может кодировать случайная последовательность ДНК, например, пептид, который идентифицировали в библиотеке фагового дисплея или комбинаторной библиотеке «одна гранула одно соединение» (ОВОС) (Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991). Примеры пептида или пептидомиметика, соединенного с дцРНК средством через встроенное мономерное звено в целях направленного воздействия на клетку, представляет собой пептид аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD) или имитатор RGD. Пептидный фрагмент может находиться в диапазоне длин приблизительно от 5 аминокислот приблизительно до 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут иметь структурную модификацию, например, для увеличения стабильности или непосредственных конформационных свойств. Можно использовать любые структурные модификации, описанные далее.

Пептид RGD для использования в композициях и способах по изобретению может быть линейным или циклическим, и его можно модифицировать, например, гликозилировать или метилировать, для того, чтобы содействовать направленному воздействию на

конкретную ткань (ткани). RGD-содержащие пептиды и пептидомиметики могут содержать D-аминокислоты, а также синтетические имитаторы RGD. В дополнение к RGD, можно использовать другие фрагменты, которые направлены на лиганд интегрин. Предпочтительные конъюгаты этого лиганда направлены на PECAM-1 или VEGF.

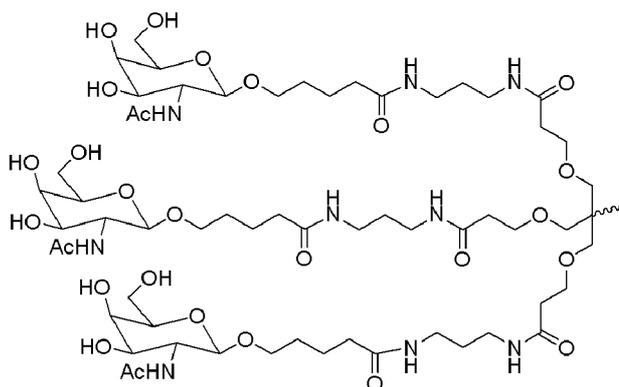
«Проникающий в клетку пептид» способен проникать в клетку, например, микробную клетку, такую как бактериальная или грибковая клетка, или клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Проникающий в микробную клетку пептид может представлять собой, например, α -спиральный линейный пептид (например,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

С. Углеводные конъюгаты

В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по изобретению иРНК олигонуклеотид дополнительно содержит углевод. Конъюгированные с углеводом иРНК благоприятны для доставки нуклеиновых кислот *in vivo*, а также композиций, подходящих для терапевтического использования *in vivo*, как описано в настоящем документе. Как используют в настоящем документе, «углевод» относится к соединению, которое или представляет собой углевод *per se*, состоящий из одного или нескольких моносахаридных звеньев, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода; или соединение, содержащее в качестве своей части молекулу углевода, выполненную из одного или

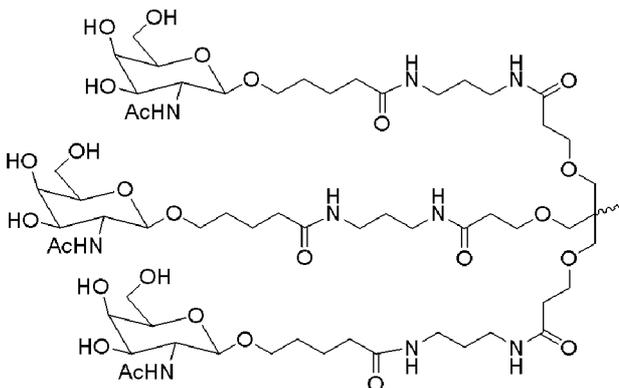
нескольких моносахаридных звеньев, каждое имеет по меньшей мере шесть атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Репрезентативные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие приблизительно от 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных звеньев) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахариды-камеди. Конкретные моносахариды включают АГТ и приведенные выше (например, АГТ, С6, С7 или С8) сахара; ди- и трисахариды включают сахара, имеющие два или три моносахаридных звена (например, АГТ, С6, С7 или С8).

В одном из вариантов осуществления углеводный конъюгат для использования в композициях и способах по изобретению представляет собой моносахарид. В одном из вариантов осуществления моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин, такой как

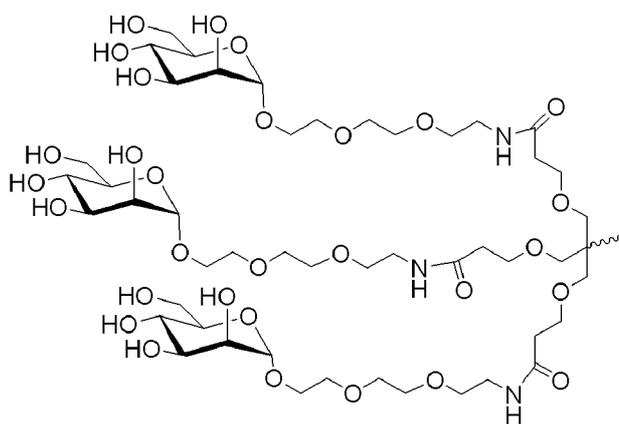


формула II.

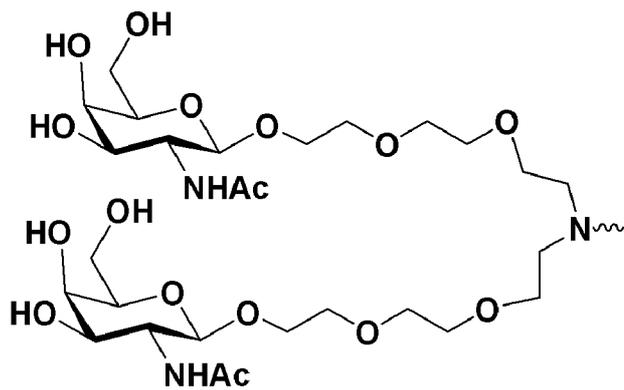
В другом варианте осуществления углеводный конъюгат для использования в композициях и способах по изобретению выбирают из группы, состоящей из:



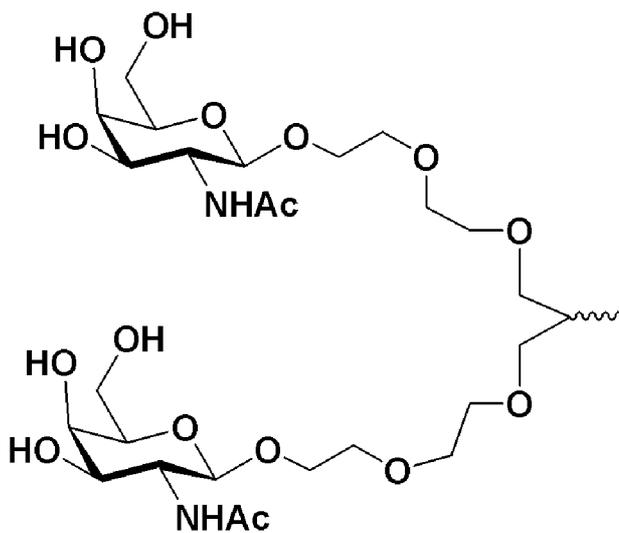
формула II,



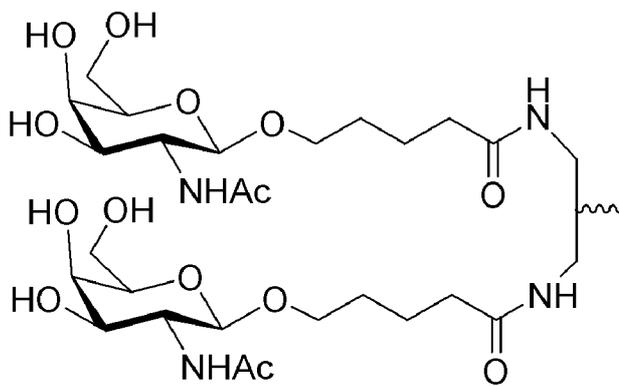
формула III,



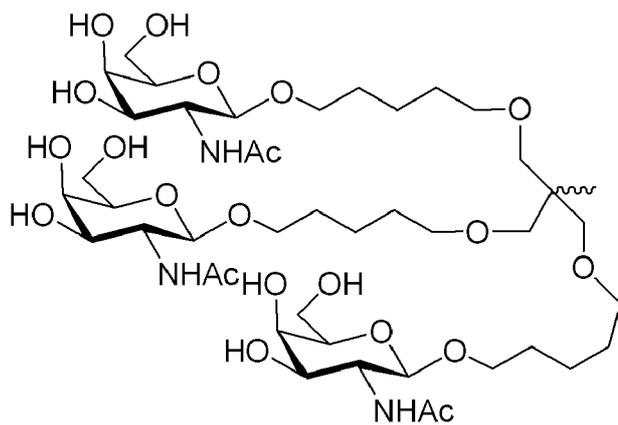
формула IV,



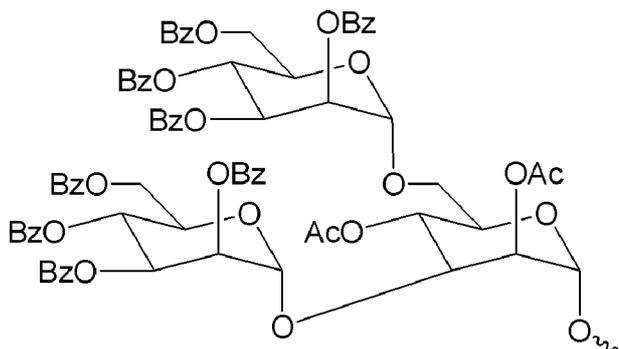
формула V,



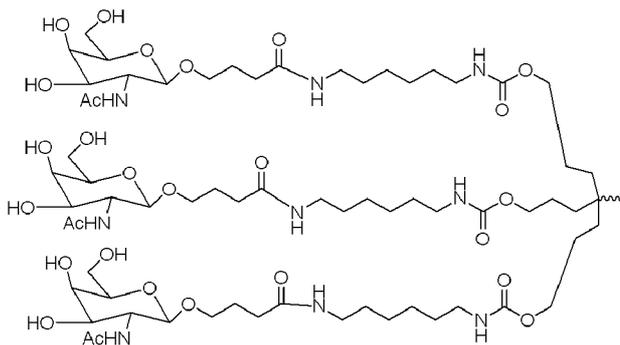
формула VI,



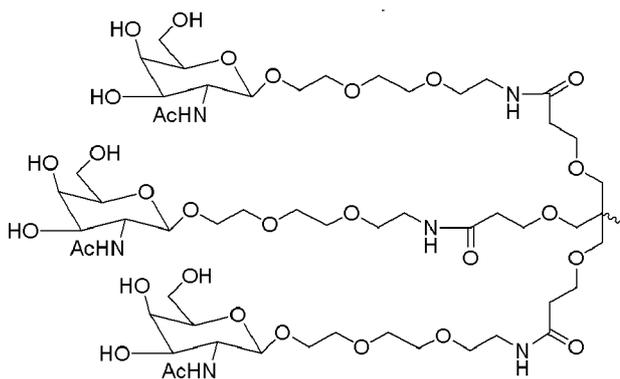
формула VII,



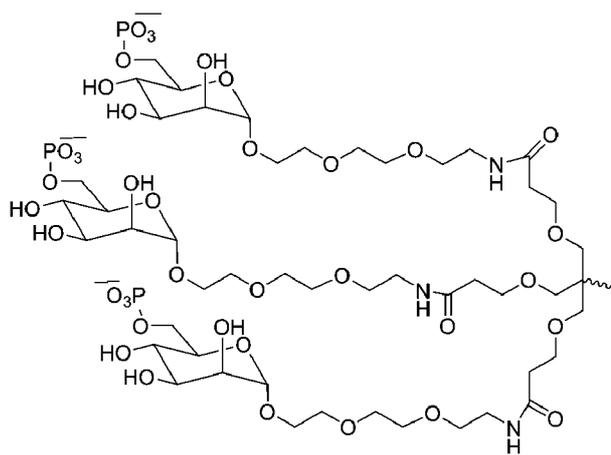
формула VIII,



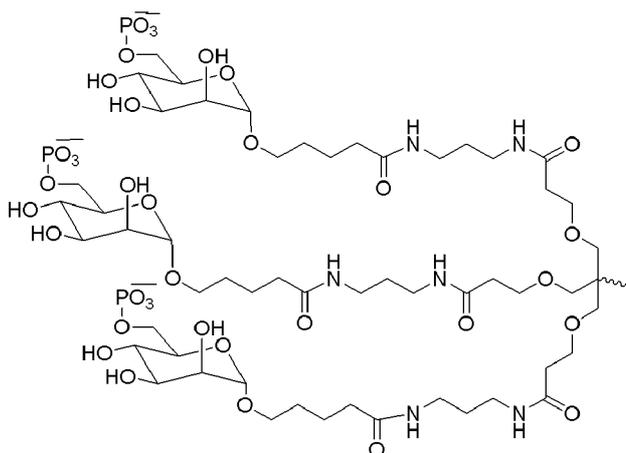
формула IX,



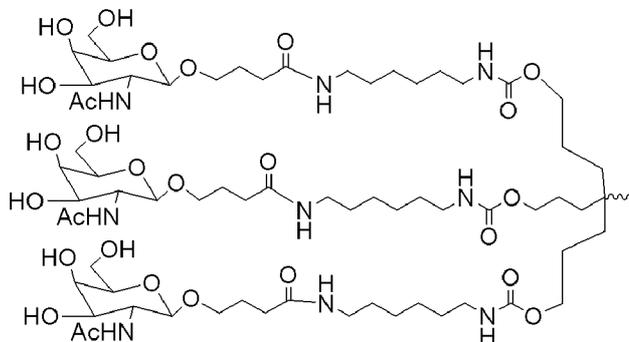
формула X,



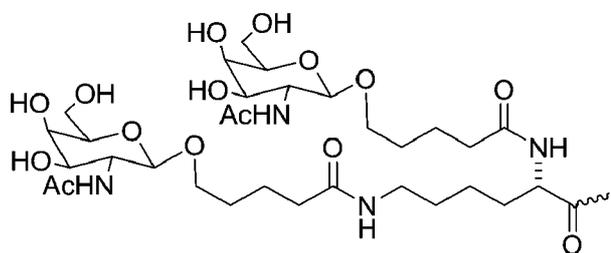
формула XI,



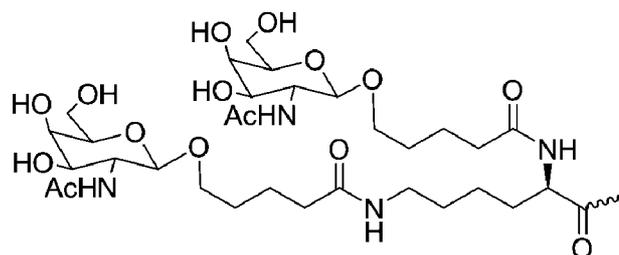
формула XII,



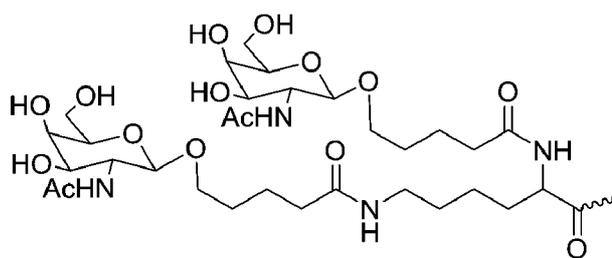
формула XIII,



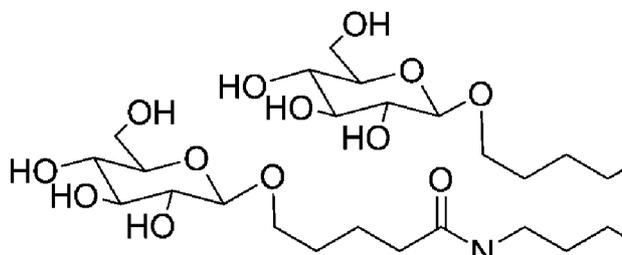
формула XIV,



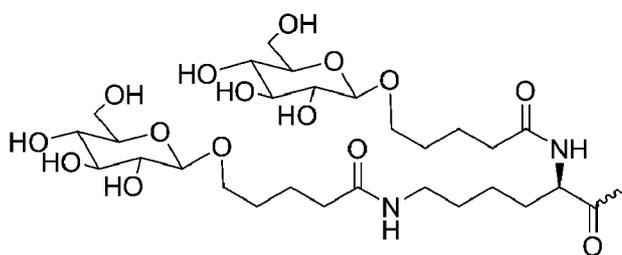
формула XV,



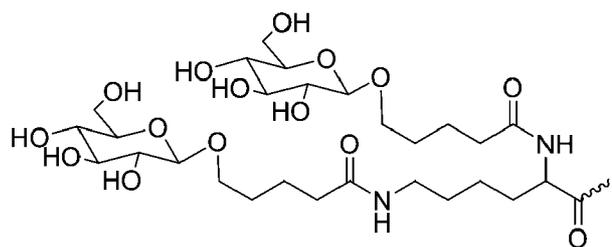
формула XVI,



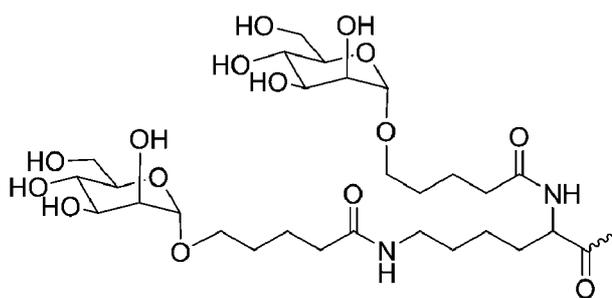
формула XVII,



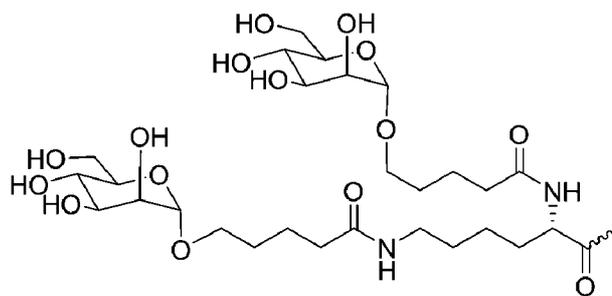
формула XVIII,



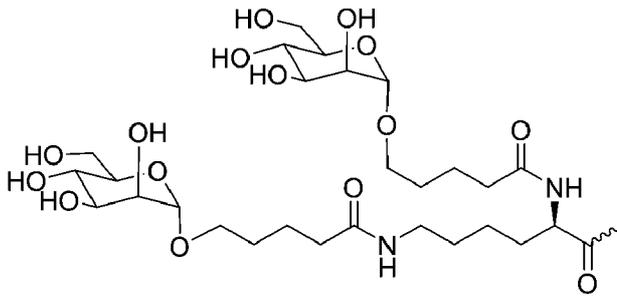
формула XIX,



формула XX,

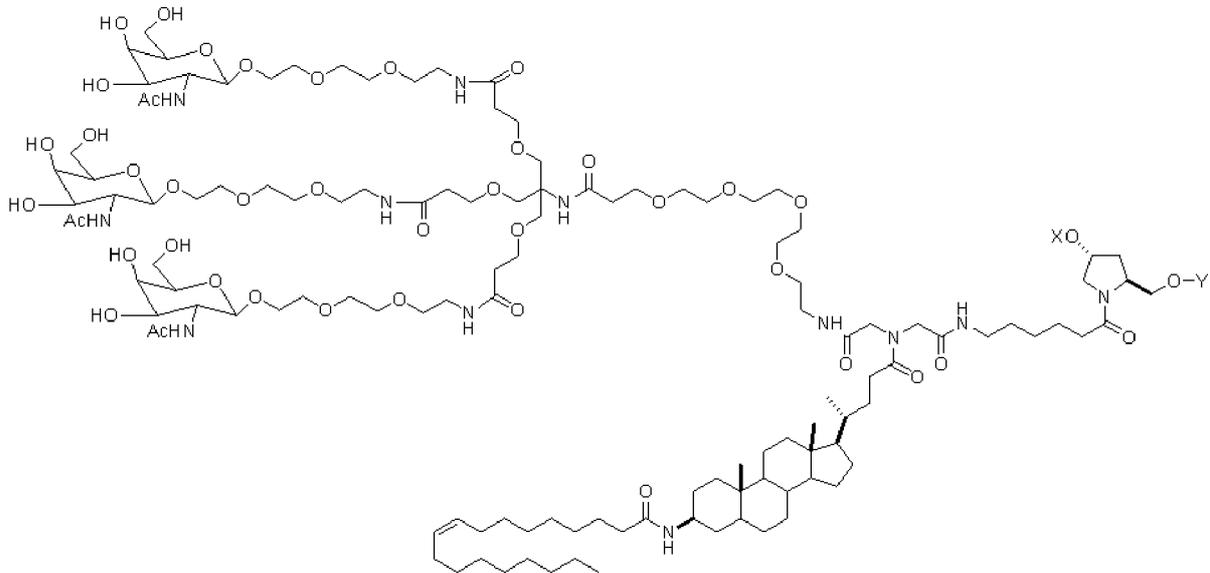


формула XXI,



формула XXII.

Другой репрезентативный углеводный конъюгат для использования в вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, включает, но не ограничиваясь этим,



(формула XXIII), когда одно из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другое представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат дополнительно содержит один или несколько дополнительных лигандов, как описано выше, таких как, но не ограничиваясь этим, ФК модулятор и/или проникающий в клетку пептид.

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

D. Линкеры

В некоторых вариантах осуществления конъюгат или лиганд, описанный в настоящем документе, можно прикреплять к иРНК олигонуклеотиду с использованием различных линкеров, которые

могут быть расщепляемыми или не расщепляемыми.

Термин «линкер» или «линкерная группа» обозначает органический фрагмент, который соединяет две части соединения, например, ковалентно скрепляет две части соединения. Линкеры типично содержат непосредственную связь или атом, такой как кислород или сера, звено, такое как NR₈, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH или цепь атомов, такую как, но не ограничиваясь этим, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкинил, алкилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкил, алкинилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, где один или несколько метиленов можно нарушать или устранять с помощью O, S, S(O), SO₂, N(R₈), C(O), замещенного или незамещенного арила, замещенного или незамещенного гетероарила, замещенного или незамещенного гетероцикла; где R₈ представляет собой водород, ацил, алифатическую или замещенную алифатическую группу. В одном из вариантов осуществления линкер составляет приблизительно 1-24 атома, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18 атомов, 7-17, 8-17, 6-16, 7-16 или 8-16 атомов.

Расщепляемая линкерная группа представляет собой ту, которая достаточно стабильна вне клетки, но которая при

попадании в целевую клетку подвергается расщеплению для высвобождения двух частей, которые линкер удерживает вместе. В предпочтительном варианте осуществления расщепляемая линкерная группа подвергается расщеплению по меньшей мере приблизительно в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или больше или по меньшей мере приблизительно 100 раз быстрее в целевой клетке или в первых эталонных условиях (которые, например, можно выбирать для того, чтобы имитировать или представлять условия внутри клетки), чем в крови субъекта, или во вторых эталонных условиях (которые, например, можно выбирать для того, чтобы имитировать или представлять условия, встречающиеся в крови или сыворотке).

Расщепляемые линкерные группы чувствительны к расщепляющим средствам, например, рН, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию разрушающих молекул. В целом, расщепляющие средства в большей степени преобладают или встречаются при более высоких уровнях или активностях внутри клеток, чем в сыворотке или крови. Примеры таких разрушающих средств включают: окислительно-восстановительные средства, которые отбирают для конкретных субстратов или которые не обладают субстратной специфичностью, в том числе, например, окислительные или восстанавливающие ферменты или восстанавливающие средства, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать окислительно-восстановительно-расщепляемую линкерную группу посредством восстановления; эстеразы; эндосомы или средства, которые могут создавать кислую среду, например, те, которые дают рН 5 или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или расщеплять кислотно-расщепляемую линкерную группу, действуя в качестве обычной кислоты, пептидазы (которые могут обладать субстратной специфичностью) и фосфатазы.

Расщепляемая связывающая группа, такая как дисульфидная связь, может быть восприимчива к рН. рН сыворотки человека составляет 7,4, тогда как усредненный внутриклеточный рН слегка ниже, в диапазоне приблизительно 7,1-7,3. Эндосомы имеют более кислый рН, в диапазоне 5,5-6,0, и лизосомы имеют еще более

кислый рН, приблизительно равный 5,0. Некоторые линкеры имеют расщепляемую линкерную группу, которая подвергается расщеплению при предпочтительном рН и тем самым высвобождает катионный липид из лиганда внутри клетки или внутри желаемого компартмента клетки.

Линкер может содержать расщепляемую линкерную группу, которая подвергается расщеплению с помощью конкретного фермента. Тип расщепляемой линкерной группы, встраиваемой в линкер, может зависеть от клетки, подлежащей направленному воздействию. Например, направляющий на печень лиганд может быть соединен с катионным липидом через линкер, который содержит сложноэфирную группу. Клетки печени богаты эстеразами и, следовательно, расщепление линкера будет проходить более эффективно в клетках печени, чем в типах клеток, которые не богаты эстеразами. Другие типы клеток, богатые эстеразами, включают клетки легких, коры почки и яичко.

Линкеры, которые содержат пептидные связи, можно использовать при направленном воздействии на типы клеток, богатые пептидазами, такими как клетки печени и синовиоциты.

В целом, пригодность кандидатной расщепляемой линкерной группы можно оценивать посредством тестирования способности разрушающего средства (или условий) расщеплять кандидатную линкерную группу. Также желательно тестировать кандидатную расщепляемую линкерную группу на способность противостоять расщеплению в крови или в контакте с другой не целевой тканью. Таким образом, можно определять относительную восприимчивость к расщеплению между первыми и вторыми условиями, где первые выбирают так, чтобы они отражали расщепление в целевой клетке, и вторые выбирают так, чтобы они отражали расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например, крови или сыворотке. Оценку можно осуществлять в бесклеточных системах, в клетках, в клеточной культуре, в органе или культуре ткани или в целых животных. Может быть полезно выполнять начальную оценку в бесклеточных или культуральных условиях и подтверждать посредством дополнительной оценки в целых животных. В предпочтительных вариантах осуществления эффективные кандидатные

соединения подвергаются расщеплению по меньшей мере приблизительно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или приблизительно 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для того, чтобы имитировать внутриклеточные условия) по сравнению с кровью или сывороткой (или в условиях *in vitro*, выбранных для того, чтобы имитировать внеклеточные условия).

i. Окислительно-восстановительно-расщепляемые линкерные группы

В одном из вариантов осуществления расщепляемая линкерная группа представляет собой окислительно-восстановительно-расщепляемую линкерную группу, которая подвергается расщеплению при восстановлении или окислении. Пример восстановительно-расщепляемой линкерной группы представляет собой дисульфидную линкерную группу (-S-S-). Чтобы определить, если кандидатная расщепляемая линкерная группа является подходящей «восстановительно-расщепляемой линкерной группой» или, например, пригодна для использования с конкретным фрагментом иРНК и конкретным направляющим средством, можно ориентироваться на способы, описанные в настоящем документе. Например, кандидата можно оценивать посредством инкубации с дитиотреитолом (DTT) или другим восстанавливающим средством, используя реактивы, известные в данной области, которые имитируют скорость расщепления, которую будут наблюдать в клетке, например, в целевой клетке. Кандидаты также можно оценивать в условиях, которые выбирают для того, чтобы имитировать условия крови или сыворотки. В крови сразу происходит расщепление кандидатных соединений самое большее приблизительно на 10%. В других вариантах осуществления эффективные кандидатные соединения разрушаются по меньшей мере приблизительно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или приблизительно 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для того, чтобы имитировать внутриклеточные условия) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных для того, чтобы имитировать внеклеточные условия). Скорость расщепления кандидатных соединений можно определять с использованием стандартных

анализов ферментативной кинетики в условиях, выбранных для того, чтобы имитировать внутриклеточную среду, и сравнивать с условиями, выбранными для того, чтобы имитировать внеклеточную среду.

ii. Расщепляемые линкерные группы на основе фосфата

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую линкерную группу на основе фосфата. Расщепляемая линкерная группа на основе фосфата подвергается расщеплению средствами, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Примеры средств, которые расщепляют фосфатные группы в клетках, представляют собой ферменты, такие как фосфатазы, в клетках. Примеры линкерных групп на основе фосфата представляют собой $-O-P(O)(ORk)-O-$, $-O-P(S)(ORk)-O-$, $-O-P(S)(SRk)-O-$, $-S-P(O)(ORk)-O-$, $-O-P(O)(ORk)-S-$, $-S-P(O)(ORk)-S-$, $-O-P(S)(ORk)-S-$, $-S-P(S)(ORk)-O-$, $-O-P(O)(Rk)-O-$, $-O-P(S)(Rk)-O-$, $-S-P(O)(Rk)-O-$, $-S-P(S)(Rk)-O-$, $-S-P(O)(Rk)-S-$, $-O-P(S)(Rk)-S-$. Предпочтительные варианты осуществления представляют собой $-O-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(S)(SH)-O-$, $-S-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(O)(OH)-S-$, $-S-P(O)(OH)-S-$, $-O-P(S)(OH)-S-$, $-S-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(O)(H)-O-$, $-O-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-O-$, $-S-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-S-$, $-O-P(S)(H)-S-$. Предпочтительный вариант осуществления представляет собой $-O-P(O)(OH)-O-$. Эти кандидаты можно оценивать с использованием способов, аналогичных тем, что описаны выше.

iii. Кислотно-расщепляемые линкерные группы

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит кислотно-расщепляемую линкерную группу. Кислотно-расщепляемая линкерная группа представляет собой линкерную группу, которая подвергается расщеплению в кислых условиях. В предпочтительных вариантах осуществления кислотно-расщепляемые линкерные группы подвергаются расщеплению в кислой среде с pH приблизительно 6,5 или ниже (например, приблизительно 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0 или ниже) или средствами, такими как ферменты, которые могут действовать в качестве обычной кислоты. В клетке, конкретные органеллы с низким pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечивать расщепляющую среду для кислотно-расщепляемых

линкерных групп. Примеры кислотно-расщепляемых линкерных групп включают, но не ограничиваясь этим, гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Кислотно-расщепляемые группы могут иметь общую формулу $-C=NN-$, $C(O)O$ или $-OC(O)$. Предпочтительный вариант осуществления это когда углерод, прикрепленный к кислороду сложного эфира (алкоксильная группа), представляет собой арильную группу, замещенную алкильную группу или третичную алкильную группу, такую как диметилпентил или т-бутил. Эти кандидаты можно оценивать с использованием способов, аналогичных тем, что описаны выше.

iv. Линкерная группа на основе сложного эфира

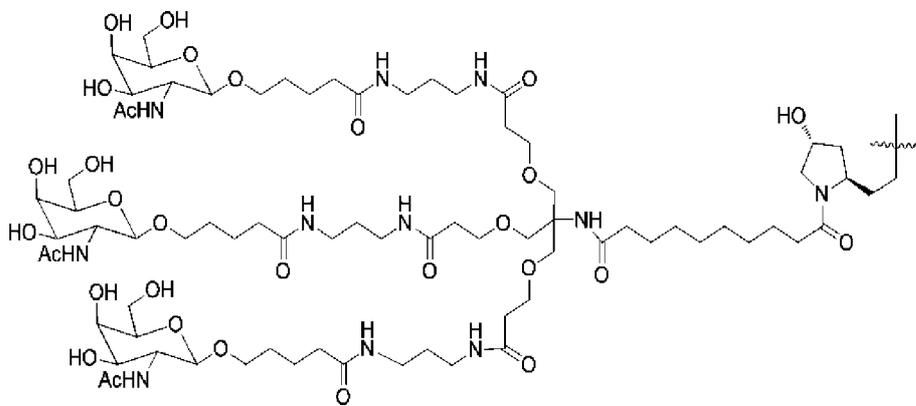
В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую линкерную группу на основе сложного эфира. Расщепляемая линкерная группа на основе сложного эфира подвергается расщеплению ферментами, такими как эстеразы и амидазы в клетках. Примеры расщепляемых линкерных групп на основе сложного эфира включают, но не ограничиваясь этим, группы сложных эфиров алкилена, алкенилена и алкинилена. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы имеют общую формулу $-C(O)O-$ или $-OC(O)-$. Эти кандидаты можно оценивать с использованием способов, аналогичных тому, что описано выше.

v. Расщепляющие группы на основе пептида

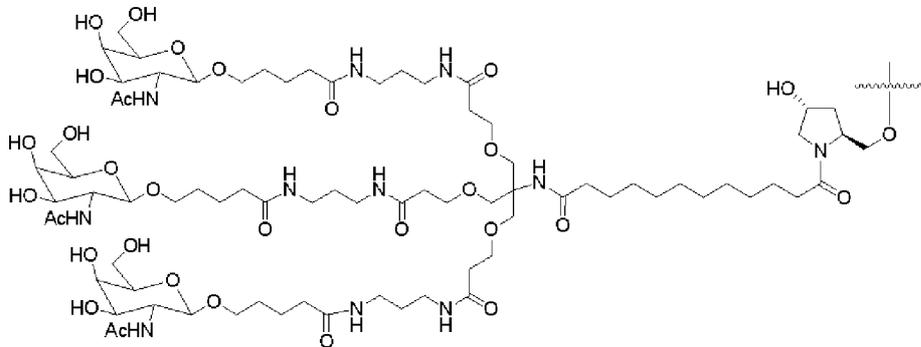
В еще одном другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую линкерную группу на основе пептида. Расщепляемая линкерная группа на основе пептида подвергается расщеплению ферментами, такими как пептидазы и протеазы в клетках. Расщепляемые линкерные группы на основе пептида представляют собой пептидные связи, сформированные между аминокислотами для получения олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т. д.) и полипептидов. Расщепляемые группы на основе пептида не включают амидную группу ($-C(O)NH-$). Амидную группу можно формировать между любым алкиленом, алкениленом или алкиниленом. Пептидная связь представляет собой амидную связь особого типа, образованную между аминокислотами для получения пептидов и белков. Расщепляемая группа на основе пептида в целом ограничена пептидной связью (т. е. амидной

связью), образованной между аминокислотами, образуя пептиды и белки, и не включает цельную амидную функциональную группу. Расщепляемые линкерные группы на основе пептида имеют общую формулу $-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-$, где RA и RB представляют собой группы R двух смежных аминокислот. Эти кандидаты можно оценивать с использованием способов, аналогичных тем, что описаны выше.

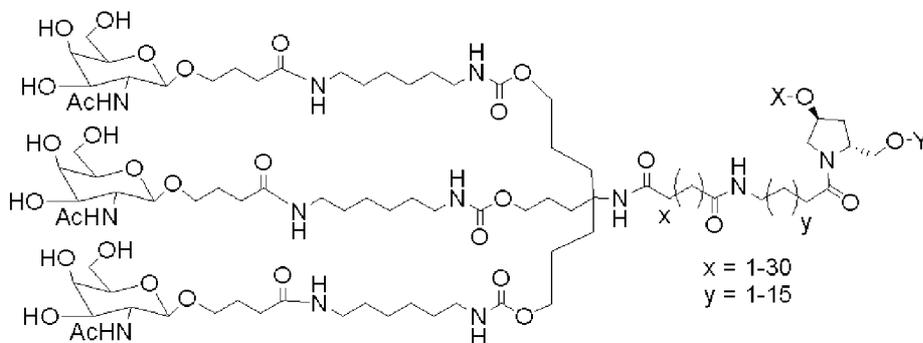
В одном из вариантов осуществления иРНК по изобретению конъюгируют с углеводом через линкер. Неограничивающие примеры углеводных конъюгатов иРНК с линкерами для композиций и способов по изобретению включают, но не ограничиваясь этим,



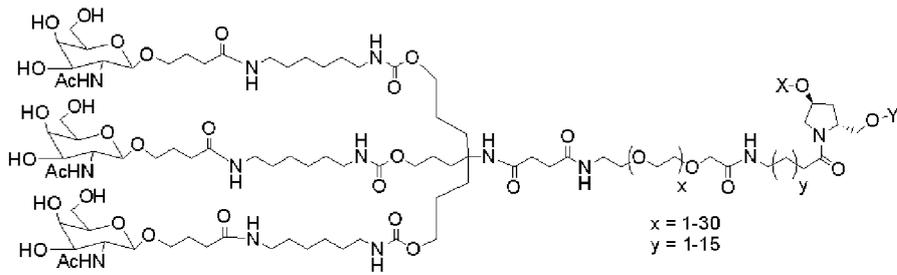
(формула XXIV),



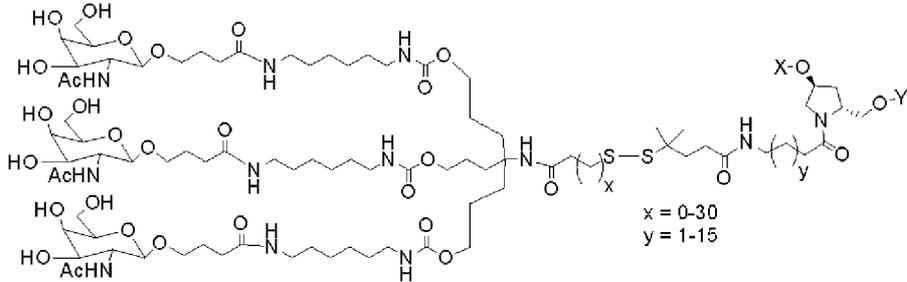
(формула XXV),



(формула XXVI),

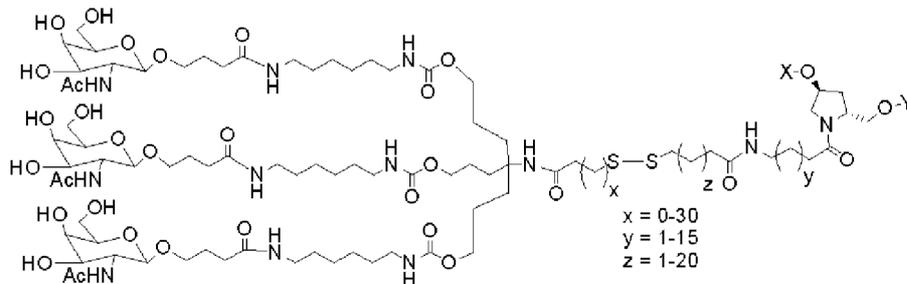


(формула XXVII),

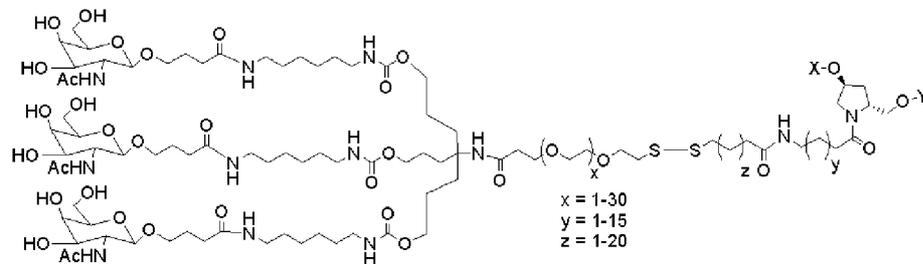


(формула

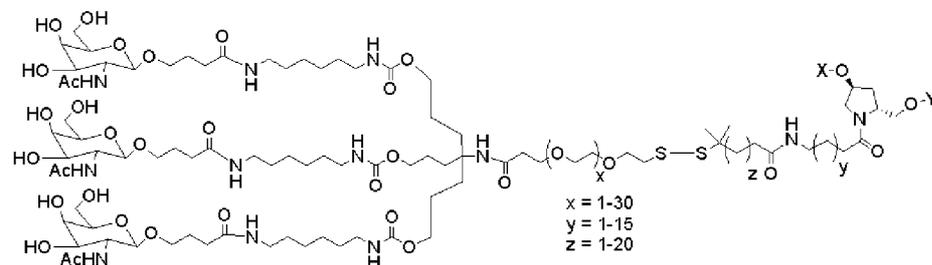
XXVIII),



(формула XXIX),



(формула XXX) и



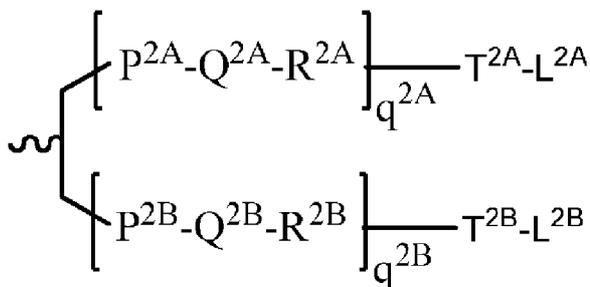
(формула XXXI),

когда одно из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другое представляет собой водород.

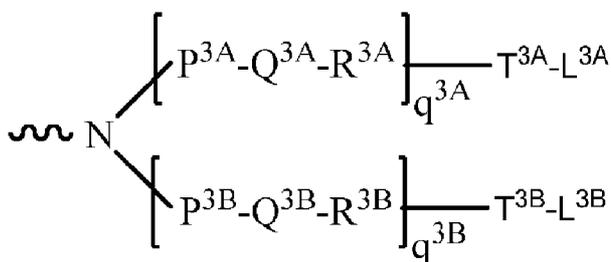
В определенных вариантах осуществления композиций и способов по изобретению лиганд представляет собой одно или несколько производных «GalNAc» (N-ацетилгалактозамина),

прикрепленных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

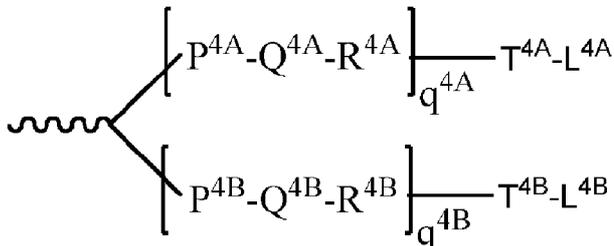
В одном из вариантов осуществления дцРНК по изобретению конъюгируют с двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, представленных в любой из формул (XXXII) - (XXXV):



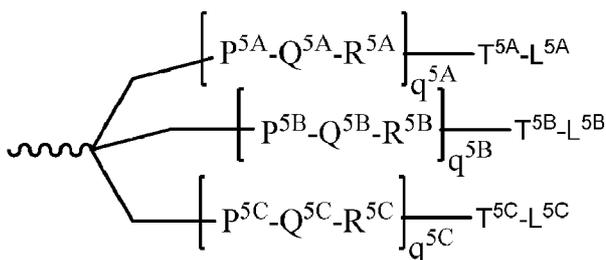
формула XXXII,



формула XXXIII,



формула XXXIV,



формула XXXV,

где:

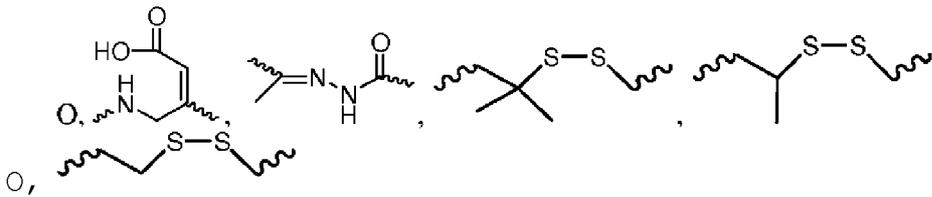
$q^{2\text{A}}$, $q^{2\text{B}}$, $q^{3\text{A}}$, $q^{3\text{B}}$, $q^{4\text{A}}$, $q^{4\text{B}}$, $q^{5\text{A}}$, $q^{5\text{B}}$ и $q^{5\text{C}}$ равно независимо для каждого появления 0-20 и где повторяющееся звено может представлять собой одно и то же или отличающееся;

$r^{2\text{A}}$, $r^{2\text{B}}$, $r^{3\text{A}}$, $r^{3\text{B}}$, $r^{4\text{A}}$, $r^{4\text{B}}$, $r^{5\text{A}}$, $r^{5\text{B}}$, $r^{5\text{C}}$, $t^{2\text{A}}$, $t^{2\text{B}}$, $t^{3\text{A}}$, $t^{3\text{B}}$, $t^{4\text{A}}$, $t^{4\text{B}}$, $t^{4\text{A}}$, $t^{5\text{B}}$, $t^{5\text{C}}$ каждое независимо представляет собой для каждого появления пустое, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH или

CH₂O;

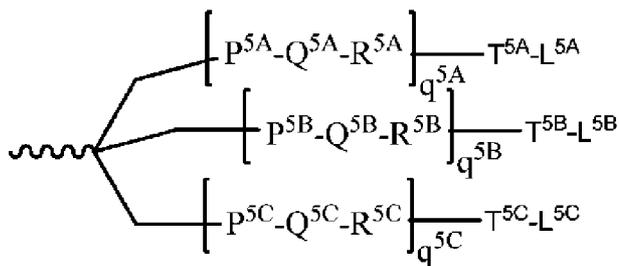
Q^{2A}, Q^{2B}, Q^{3A}, Q^{3B}, Q^{4A}, Q^{4B}, Q^{5A}, Q^{5B}, Q^{5C} представляют собой независимо для каждого появления пустое, алкилен, замещенный алкилен, где один или несколько метиленов можно нарушать или устранять с помощью одного или нескольких из O, S, S(O), SO₂, N(RN), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

R^{2A}, R^{2B}, R^{3A}, R^{3B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{5C} каждое независимо представляет собой для каждого появления пустое, NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-



или гетероциклил;

L^{2A}, L^{2B}, L^{3A}, L^{3B}, L^{4A}, L^{4B}, L^{5A}, L^{5B} и L^{5C} представляют лиганд; т. е. каждый независимо для каждого появления представляет собой моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и R^a представляет собой H или боковую цепь аминокислоты. Трехвалентные конъюгирующие производные GalNAc особенно эффективны при использовании с РНК средствами для ингибирования экспрессии целевого гена, такими как таковые формулы (XXXV):



формула XXXV,

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

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

Репрезентативные патенты США, в которых изложено получение РНК конъюгатов, включают, но не ограничиваясь этим, патенты США

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

Нет необходимости, чтобы все положения в данном соединении были единообразно модифицированы, и фактически больше чем одну из указанных выше модификаций можно встраивать в одно соединение или даже в один нуклеозид в иРНК. Настоящее изобретение также относится к соединениям иРНК, которые представляют собой химерные соединения.

«Химерные» соединения иРНК или «химеры», в контексте данного изобретения, представляют собой соединения иРНК, предпочтительно дцРНК, которые содержат два или более химически различающихся области, каждая состоит из по меньшей мере одного мономерного звена, т. е., нуклеотида в случае соединения дцРНК. Эти иРНК типично содержат по меньшей мере одну область, в которой РНК модифицируют с тем, чтобы придавать иРНК увеличенную устойчивость к деградации нуклеазами, увеличенное накопление в клетках и/или увеличенную аффинность связывания с целевой нуклеиновой кислотой. Дополнительная область иРНК может служить в качестве субстрата для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. В качестве примера, РНКазы Н представляет собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет цепь РНК дуплекса РНК:ДНК. Следовательно, активация РНКазы Н ведет к расщеплению целевой РНК, тем самым значительно увеличивая эффективность иРНК ингибирования экспрессии гена. Следовательно, сравнимые результаты часто можно получать с использованием более коротких иРНК, когда используют химерную дцРНК, по сравнению с гибридизацией фосфориоатдезоксид-дцРНК с той же целевой

областью. Расщепление целевой РНК можно обычным образом обнаруживать с помощью электрофореза в геле и, в случае необходимости, способов гибридизации с ассоциированными нуклеиновыми кислотами, известных в данной области.

В определенных случаях РНК в иРНК можно модифицировать с помощью нелигандной группы. Множество нелигандных молекул конъюгировано с иРНК для того, чтобы увеличивать у иРНК активность, распределение в клетках или накопление в клетках, а процедуры для осуществления таких конъюгаций доступны в научной литературе. Такие нелигандные фрагменты включают липидные фрагменты, такие как холестерин (Kubo, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), холевую кислоту (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), простой тиоэфир, например, гексил-S-третилтиол (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), тиохолестерин (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), алифатическую цепь, например, остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49), фосфолипид, например, дагексадецил-рац-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-O-гексадецил-рац-глицеро-3-N-фосфонат (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969) или адамантануксусную кислоту (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229) или фрагмент октадециламина или гексиламино-карбонил-оксихолестерина (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Репрезентативные патенты США, в которых изложено получение таких конъюгатов РНК, перечислены выше. Типичные протоколы конъюгации включают синтез РНК, несущей амиолинкер в одном или нескольких положениях последовательности. Затем проводят реакцию аминогруппы с молекулой, конъюгированной с использованием подходящих

связывающих или активирующих реагентов. Реакцию конъюгации можно осуществлять или с РНК, все еще связанной с твердым носителем, или после отщепления РНК в фазе раствора. Очистка конъюгата РНК посредством ВЭЖХ типично дает чистый конъюгат.

V. Доставка иРНК по изобретению

Доставку иРНК по изобретению в клетку, например, клетку внутри субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект, который имеет заболевание или состояние, ассоциированное с ангиотензином) можно осуществлять множеством различных путей. Например, доставку можно осуществлять посредством приведения клетки в контакт с иРНК по изобретению или *in vitro* или *in vivo*. Доставку *in vivo* также можно осуществлять непосредственно через введение композиции, которая содержит иРНК, например, дцРНК, субъекту. Альтернативно, доставку *in vivo* можно осуществлять опосредованно через введение одного или нескольких векторов, которые кодируют иРНК и управляют ее экспрессией. Эти альтернативы дополнительно рассмотрены далее.

В целом, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) можно адаптировать для использования с иРНК по изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian RL. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144 и W094/02595, которые включены в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте). Для доставки *in vivo*, факторы, рассматриваемые при доставке молекулы иРНК, включают, например, биологическую стабильность доставляемой молекулы, предотвращение неспецифических эффектов и накопление доставляемой молекулы в целевую ткань. Неспецифические эффекты иРНК можно минимизировать посредством локального введения, например, посредством прямой инъекции или имплантации в ткань или топического введения препарата. Местно введение в место лечения максимизирует локальную концентрацию средства, ограничивает воздействие средства на системные ткани, которые иначе могут пострадать от средства или которые могут разрушать средство, и делает возможной более низкую суммарную дозу молекулы иРНК, подлежащую введению. Некоторые исследования показали успешный нокдаун продуктов генов, когда иРНК вводят

локально. Например, показано, что внутриглазная доставка дцРНК VEGF посредством интравитреальной инъекции яванским макакам (Tolentino, MJ., et al (2004) *Retina* 24:132-138) и субретинальной инъекции мышам (Reich, SJ., et al (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) предотвращает неваскуляризацию в экспериментальной модели возрастной дегенерации желтого пятна. Кроме того, прямая инъекция дцРНК в опухоль мышам снижает объем опухоли (Pille, J., et al (2005) *Mol. Ther.* 11:267-274) и может продлевать выживаемость мышей-опухоленосителей (Kim, WJ., et al (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350; Li, S., et al (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523). Также показан успех РНК-интерференции при местной доставке в ЦНС посредством прямой инъекции (Dorn, G., et al. (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH., et al (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H., et al (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., et al (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., et al (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya, Y., et al (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602) и в легкие посредством интраназального введения (Howard, KA., et al (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X., et al (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Vitko, V., et al (2005) *Nat. Med.* 11:50-55). Для введения иРНК системно для лечения заболевания РНК можно модифицировать или альтернативно доставлять с использованием системы доставки лекарственного средства; оба способа действуют для того, чтобы предотвращать быструю деградацию дцРНК эндо- и экзонуклеазами *in vivo*. Модификация РНК или фармацевтического носителя также может позволять направлять композицию иРНК в целевую ткань и избегать нежелательных эффектов за пределами мишени. Молекулы иРНК можно модифицировать посредством химической конъюгации с липофильными группами, такими как холестерин, чтобы увеличивать накопление в клетках и предотвращать деградацию. Например, иРНК, направленную против АроВ и конъюгированную с липофильным фрагментом холестерина, инъекцировали системно мышам, что вело к нокдауну мРНК ароВ как в печени, так и в тощей кишке (Soutschek, J., et al (2004) *Nature* 432:173-178). Показано, что конъюгация иРНК с аптамером ингибирует опухолевый рост и опосредует регресс опухоли в модели

злокачественной опухоли предстательной железы на мышцах (McNamara, JO., et al (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). В альтернативном варианте осуществления иРНК можно доставлять с использованием систем доставки лекарственных средств, таких как система доставки в наночастицах, дендримерная, полимерная, липосомальная или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки облегчают связывание молекулы иРНК (отрицательно заряженной) и также усиливают взаимодействия на отрицательно заряженной клеточной мембране, чтобы сделать возможным эффективное накопление иРНК в клетке. Катионные липиды, дендримеры или полимеры можно или связывать с иРНК или индуцировать формирование везикул или мицелл (см., например, Kim SH., et al (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), которые заключают иРНК. Формирование везикул или мицелл дополнительно предотвращает деградацию иРНК при системном введении. Специалисту в данной области хорошо известны способы получения и введения катионных иРНК комплексов (см., например, Sorensen, DR., et al (2003) *J. Mol. Biol* 327:761-766; Verma, UN., et al (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS et al (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, которые включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственных средств, которые можно использовать для системной доставки иРНК, включают DOTAP (Sorensen, DR., et al (2003), выше; Verma, UN., et al (2003), выше), олигофектамин, «твердые липидные частицы с нуклеиновой кислотой» (Zimmermann, TS., et al (2006) *Nature* 441:111-114), кардиолипин (Chien, PY., et al (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A., et al (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), полиэтиленимин (Bonnet ME., et al (2008) *Pharm. Res.* электронная публикация 16 августа в преддверии печати; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), пептиды Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487) и полиамидоамины (Tomalia, DA., et al (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., et al (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). В некоторых вариантах осуществления для системного введения иРНК образует комплекс с циклодекстрином. Способы введения и фармацевтические

композиции иРНК и циклодекстринов можно найти в патенте США № 7427605, который включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

А. Кодированные вектором иРНК по изобретению

иРНК, направленную на ген AGT, можно экспрессировать с транскрипционных единиц, вставленных в ДНК или РНК векторы (см., например, Couture, A, et al., TIG. (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., международную публикацию РСТ WO 00/22113, Conrad, международную публикацию РСТ № WO 00/22114 и Conrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть временной (порядка от часов до недель) или постоянной (от недель до месяцев или дольше), в зависимости от конкретной используемой конструкции и целевой ткани или типа клеток. Эти трансгены можно вводить в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может представлять собой интегрирующий или неинтегрирующий вектор. Трансген также можно сконструировать так, чтобы сделать возможным его наследование в качестве внехромосомной плазмиды (Gassmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:1292).

Отдельную цепь или цепи иРНК можно транскрибировать с промотора на экспрессирующем векторе. Когда две отдельные цепи подлежат экспрессии для того, чтобы генерировать, например, дцРНК, в целевую клетку можно совместно вводить два отдельных экспрессирующих векторах (например, посредством трансфекции или инфекции). Альтернативно каждую отдельную цепь дцРНК можно транскрибировать с помощью промоторов, оба из которых расположены на одной и той же экспрессирующей плазмиде. В одном из вариантов осуществления дцРНК экспрессируют в виде полинуклеотидов с инвертированными повторами, соединенных с помощью линкерной полинуклеотидной последовательности так, что дцРНК имеет структуру «стебель и петля».

иРНК экспрессирующие векторы в целом представляют собой ДНК плазмиды или вирусные векторы. Экспрессирующие векторы, совместимые с эукариотическими клетками, предпочтительно те, которые совместимы с клетками позвоночных, можно использовать для получения рекомбинантных конструкций для экспрессии иРНК,

как описано в настоящем документе. Экспрессирующие векторы эукариотических клеток хорошо известны в данной области и доступны во множестве коммерческих источников. Типично, предусмотрены такие векторы, которые содержат удобные участки рестрикции для вставки желаемого сегмента нуклеиновой кислоты. Доставка иРНК экспрессирующих векторов может быть системной, например, посредством внутривенного или внутримышечного введения, посредством введения в целевые клетки, эксплантационные из пациента, после чего следует повторное введение пациенту, или посредством какого-либо другого средства, которое допускает введение в желаемую целевую клетку.

иРНК экспрессирующие плазмиды можно трансфицировать в целевые клетки в виде комплекса с катионными липидными носителями (например, олигофектамин) или носителями на основе некатионных липидов (например, Transit-ТКОТМ). Изобретением также предусмотрено множество липидных трансфекций для иРНК-опосредованных нокдаунов, направленных на различные области целевой РНК в течение периода в неделю или больше. Можно осуществлять мониторинг успешного введения векторов в клетки-хозяева с использованием различных известных способов. Например, о временной трансфекции может сигнализировать репортер, такой как флуоресцентный маркер, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP). Стабильную трансфекцию клеток *ex vivo* можно обеспечивать, используя маркеры, которые предоставляют трансфицированным клеткам устойчивость к конкретным факторам среды (например, к антибиотикам и лекарственным средствам), такую как устойчивость к гигромицину В.

Системы вирусных векторов, которые можно использовать со способами и композициями, описанными в настоящем документе, включают, но не ограничиваясь этим, (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, включая в качестве неограничивающих примеров лентивирусные векторы, вирус мышинного лейкоза Молони и т. д.; (c) аденоассоциированные вирусные векторы; (d) векторы из вируса простого герпеса; (e) векторы из SV 40; (f) векторы из вируса полиомы; (g) векторы из вируса папилломы; (h) пикорнавирусные векторы; (i) векторы из вирусов оспы, таких как

ортопоксивирусы, например, векторы из вируса осповакцины, или авипоксвирусы, например, оспа канареек или оспа надотряда *Galloanserae*; и (j) желпер-зависимые или «выпотрошенные» аденовирусы. Вирусы с дефектом репликации также могут быть благоприятны. Различные векторы будут или не будут встраиваться в геном клетки. При желании, конструкции могут включать вирусные последовательности для трансфекции. Альтернативно, конструкцию можно встраивать в векторы, способные к эписомной репликации, например, векторы EPV и EBV. Для конструкций для рекомбинантной экспрессии иРНК в целом требуются регуляторные элементы, например, промоторы, энхансеры и т. д., чтобы обеспечивать экспрессию иРНК в целевых клетках. Другие аспекты векторов и конструкций, подлежащие рассмотрению, дополнительно описаны далее.

Векторы, которые можно использовать для доставки иРНК, содержат регуляторные элементы (промотор, энхансер и т. д.), достаточные для экспрессии иРНК в желаемой целевой клетке или ткани. Регуляторные элементы можно выбирать для обеспечения конститутивной или регулируемой/индуцируемой экспрессии.

Экспрессию иРНК можно точно регулировать, например, с использованием индуцибельной регуляторной последовательности, которая чувствительна к определенным физиологическим регуляторам, например, к уровням глюкозы в циркуляции или гормонам (Docherty et al., 1994, *FASEB J.* 8:20-24). Такие индуцибельные экспрессирующие системы, подходящие для контроля иРНК экспрессии в клетках или у млекопитающих включают, например, регуляцию с помощью экизона, эстрогена, прогестерона, тетрациклина, химических индукторов димеризации и изопропил-бета-D1-тиогактопиранозида (IPTG). Специалист в данной области сможет выбрать подходящую регуляторную/промоторную последовательность на основании предполагаемого использования иРНК трансгена.

Можно использовать вирусные векторы, которые содержат последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие иРНК. Например, можно использовать ретровирусный вектор (см. Miller et al., *Meth. Enzymol.* 217:581-599 (1993)). Эти ретровирусные

векторы содержат компоненты, необходимые для корректной упаковки вирусного генома и встраивания в клетку-хозяина ДНК. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие иРНК, клонируют в один или несколько векторов, которые облегчают доставку нуклеиновой кислоты пациенту. Дополнительные подробности о ретровирусных векторах можно найти, например, в Boesen et al., *Biortherapy* 6:291-302 (1994), где описано использование ретровирусного вектора для того, чтобы доставлять ген *mdr1* в гематопозитический стволовые клетки для того, чтобы делать стволовые клетки более устойчивыми к химиотерапии. Другие источники, в которых проиллюстрировано использование ретровирусных векторов в генной терапии: Clowes et al., *J. Clin. Invest.* 93:644-651 (1994); Kiem et al., *Blood* 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4:129-141 (1993); и Grossman and Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114 (1993). Лентивирусные векторы, предполагаемые для использования, включают, например, векторы на основе ВИЧ, описанные в патентах США №№ 6143520; 5665557; и 5981276, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Аденовирусы также предусмотрены для использования в доставке иРНК по изобретению. Аденовирусы представляют собой особенно привлекательные переносчики, например, для доставки генов в эпителий дыхательных путей. В природе аденовирусы инфицируют эпителий дыхательных путей, где они вызывают легкое заболевание. Другие мишени для системы доставки на основе аденовирусов представляют собой печень, центральную нервную систему, клетки эндотелия и мышцы. Аденовирусы имеют такое преимущество, что они способны инфицировать неделящиеся клетки. В Kozarsky and Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) приведен обзор генной терапии на основе аденовирусов. В Bout et al., *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) продемонстрировано использование аденовирусных векторов для переноса генов в эпителий дыхательных путей макаков-резусов. Другие случаи использования аденовирусов в генной терапии можно найти в Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., *J. Clin.*

Invest. 91:225-234 (1993); публикации PCT WO94/12649; и Wang, et al., Gene Therapy 2:775-783 (1995). Подходящий AV вектор для экспрессии иРНК по изобретению, способ конструирования рекомбинантного AV вектора и способ доставки вектора в целевые клетки описаны у Xia H et al. (2002), Nat. Biotech. 20: 1006-1010.

Векторы из аденоассоциированных вирусов (AAV) также можно использовать для того, чтобы доставлять иРНК по изобретению (Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); патент США № 5436146). В одном из вариантов осуществления иРНК можно экспрессировать в виде двух отдельных комплементарных одноцепочечных молекул РНК с рекомбинантного AAV вектора, имеющего, например, РНК промоторы U6 или H1 или промотор цитомегаловируса (CMV). Подходящие AAV векторы для экспрессии дцРНК по изобретению, способы конструирования рекомбинантного AV вектора и способы доставки векторов в целевые клетки описаны у Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher K J et al. (1996), J. Virol, 70: 520-532; Samulski R et al. (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; в патенте США № 5252479; в патенте США № 5139941; международной патентной заявке WO 94/13788; и международной патентной заявке WO 93/24641, полное раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Другой вирусный вектор, подходящий для доставки иРНК по изобретению представляет собой поксвирус, такой как вирус осповакцины, например, аттенуированный вирус осповакцины, такой как модифицированный вирус Ankara (MVA) или NYVAC, оспы птиц, такой оспы надотряда Galloanserae или оспы канареек.

Тропизм вирусных векторов можно модифицировать посредством псевдотипирования векторов с использованием оболочечных белков или других поверхностных антигенов от других вирусов или посредством замены различных белков вирусного капсида, в зависимости от ситуации. Например, лентивирусные векторы можно псевдотипировать с использованием поверхностных белков с вируса везикулярного стоматита (VSV), бешенства, Эболы, Мокола и т. п. Можно создавать AAV векторы, направленные на различные клетки посредством конструирования векторов, экспрессирующих капсидные

белки различных серотипов; см., например, Rabinowitz J E et al. (2002), J Virol 76:791-801, полное раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Фармацевтический препарат вектора может содержать вектор в приемлемом разбавителе или может содержать матрицу медленного высвобождения, в которую встраивают носитель для доставки гена. Альтернативно, когда из рекомбинантных клеток можно получать интактный полный вектор для доставки гена, например, ретровирусный вектор, фармацевтический препарат может содержать одну или несколько клеток, которые продуцируют систему доставки генов.

VI. Фармацевтические композиции по изобретению

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям и составам, которые включают иРНК по изобретению. В одном из вариантов осуществления, предусмотренном в настоящем документе, фармацевтические композиции содержат иРНК, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие иРНК, можно использовать для лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией или активностью гена АГТ. Такие фармацевтические композиции формулируют на основании способа доставки. Один из примеров представляет собой композиции, которые формулируют для системного введения через парентеральную доставку, например, посредством подкожной (SC) или внутривенной (IV) доставки. Другой пример представляет собой композиции, которые формулируют для непосредственной доставки в паренхиму головного мозга, например, посредством инфузии в головной мозг, например, посредством непрерывной инфузии с помощью насоса. Фармацевтические композиции по изобретению можно вводить в дозах, достаточных для того, чтобы ингибировать экспрессию гена АГТ. В целом, подходящая доза иРНК по изобретению находится в диапазоне приблизительно от 0,001 приблизительно до 200,0 миллиграмма на килограмм массы тела реципиента в сутки, в целом в диапазоне приблизительно от 1 до 50 мг на килограмм массы тела в сутки. Например, дцРНК можно вводить по приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,05 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг,

приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 1,5 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 40 мг/кг или приблизительно 50 мг/кг на однократную дозу.

Например, дцРНК можно вводить в дозе приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или приблизительно 10 мг/кг. Значения и диапазоны между указанными значениями также предназначены в качестве части данного изобретения.

В другом варианте осуществления дцРНК вводят в дозе приблизительно от 0,1 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 0,25 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 0,5 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 0,75 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 1 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 1,5 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 2 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 2,5 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 3 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 3,5 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 4 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 4,5 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 5 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 7,5 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 10 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 15 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 20 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 20 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 25 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 25 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 30 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 35 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 40 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 45 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 0,1 приблизительно

до 30 мг/кг, приблизительно от 0,25 приблизительно до 30 мг/кг, приблизительно от 0,5 приблизительно до 30 мг/кг, приблизительно от 0,75 приблизительно до 30 мг/кг, приблизительно от 1 приблизительно до 30 мг/кг, приблизительно от 1,5 приблизительно до 30 мг/кг, приблизительно от 2 приблизительно до 30 мг/кг, приблизительно от 2,5 приблизительно до 30 мг/кг, приблизительно от 3 приблизительно до 30 мг/кг, приблизительно от 3,5 приблизительно до 30 мг/кг, приблизительно от 4 приблизительно до 30 мг/кг, приблизительно от 4,5 приблизительно до 30 мг/кг, приблизительно от 5 приблизительно до 30 мг/кг, приблизительно от 7,5 приблизительно до 30 мг/кг, приблизительно от 10 приблизительно до 30 мг/кг, приблизительно от 15 приблизительно до 30 мг/кг, приблизительно от 20 приблизительно до 30 мг/кг, приблизительно от 20 приблизительно до 30 мг/кг, приблизительно от 25 приблизительно до 30 мг/кг, приблизительно от 0,1 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 0,25 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 0,5 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 0,75 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 1 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 1,5 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 2 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 2,5 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 3 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 3,5 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 4 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 4,5 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 5 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 7,5 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 10 приблизительно до 20 мг/кг, или приблизительно 15 приблизительно до 20 мг/кг. Значения и диапазоны между указанными значениями также предназначены в качестве части данного изобретения.

Например, дцРНК можно вводить в дозе приблизительно 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5,

5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, или приблизительно 10 мг/кг. Значения и диапазоны между указанными значениями также предназначены в качестве части данного изобретения.

В другом варианте осуществления дцРНК вводят в дозе приблизительно 0,5 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 0,75 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 1 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 1,5 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 2 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 2,5 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 3 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 3,5 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 4 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 4,5 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 5 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 7,5 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 10 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 15 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 20 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 20 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 25 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 25 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 30 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 35 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 40 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 45 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 0,5 приблизительно до 45 мг/кг, приблизительно от 0,75 приблизительно до 45 мг/кг, приблизительно от 1 приблизительно до 45 мг/кг, приблизительно от 1,5 приблизительно до 45 мг/кг, приблизительно от 2 приблизительно до 45 мг/кг, приблизительно от 2,5 приблизительно до 45 мг/кг, приблизительно от 3 приблизительно до 45 мг/кг, приблизительно от 3,5 приблизительно до 45 мг/кг, приблизительно от 4 приблизительно до 45 мг/кг, приблизительно от 4,5 приблизительно до 45 мг/кг, приблизительно от 5 приблизительно до 45 мг/кг, приблизительно от 7,5 приблизительно до 45 мг/кг, приблизительно от 10 приблизительно до 45 мг/кг, приблизительно от 15 приблизительно до 45 мг/кг,

до 20 мг/кг, приблизительно от 0,75 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 1 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 1,5 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 2 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 2,5 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 3 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 3,5 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 4 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 4,5 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 5 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 7,5 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 10 приблизительно до 20 мг/кг, или приблизительно 15 приблизительно до 20 мг/кг. В одном из вариантов осуществления дцРНК вводят в дозе приблизительно от 10 мг/кг приблизительно до 30 мг/кг. Значения и диапазоны между указанными значениями также предназначены в качестве части данного изобретения.

Например, субъектам можно вводить, например, подкожно или внутривенно, одно терапевтическое количество иРНК, такое как приблизительно 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525, 0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или приблизительно 50 мг/кг. Значения и диапазоны между указанными значениями также предназначены в качестве части данного изобретения.

В некоторых вариантах осуществления субъектам вводят,

например, подкожно или внутривенно, множество доз терапевтического количества иРНК, таких как доза приблизительно 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525, 0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или приблизительно 50 мг/кг. Схема множественного дозирования может включать введение терапевтического количества иРНК ежедневно, например, в течение двух суток, трех суток, четырех суток, пяти суток, шести суток, семи суток или дольше.

В других вариантах осуществления субъектам вводят, например, подкожно или внутривенно, повторную дозу терапевтического количества иРНК, такую как доза приблизительно 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525, 0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19,

19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или приблизительно 50 мг/кг. Схема повторного дозирования может включать введение терапевтического количества иРНК на регулярной основе, например, через сутки, каждые третьи сутки, каждые четвертые сутки, два раза в неделю, раз в неделю, через неделю или раз в месяц. В определенных вариантах осуществления иРНК вводят приблизительно от одного раза в месяц приблизительно до одного раза в квартал (т. е., приблизительно один раз через три месяца).

После начальной схемы лечения, лечение можно вводить на менее частой основе.

В определенных вариантах осуществления, например, когда композиция по изобретению содержит дцРНК, как описано в настоящем документе, и липид, субъектам можно вводить терапевтическое количество иРНК, такое как приблизительно от 0,01 мг/кг приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 0,01 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 0,05 мг/кг приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 0,05 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 0,2 мг/кг приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 0,2 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 0,3 мг/кг приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 0,3 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 0,4 мг/кг приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 0,4 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 0,5 мг/кг приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 0,5 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 1 мг/кг приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 1 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 1,5 мг/кг приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 1,5 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 2 мг/кг приблизительно до приблизительно 2,5 мг/кг, приблизительно от 2

мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 3 мг/кг
 приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 3 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 3,5 мг/кг
 приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 4 мг/кг
 приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 4,5 мг/кг
 приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 4 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 4,5 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 5 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 5,5 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 6 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 6,5 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 7 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 7,5 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 8 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 8,5 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 9 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг или приблизительно от 9,5 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг. Значения и диапазоны между
 указанными значениями также предназначены в качестве части
 данного изобретения.

Например, дцРНК можно вводить в дозе приблизительно 0,1,
 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4,
 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7,
 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,
 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3,
 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6,
 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9,
 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2,
 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или приблизительно 10 мг/кг.
 Значения и диапазоны между указанными значениями также
 предназначены в качестве части данного изобретения.

В определенных вариантах осуществления, например, когда
 средство из двухцепочечной РНКи содержит модификацию (например,
 одинили несколько мотивов из трех идентичных модификаций в трех
 последовательных нуклеотидах), в том числе один такой мотив в
 сайте расщепления средства или около него, шесть фосфориоатных

приблизительно до 0,09 мг/кг, приблизительно от 0,04 мг/кг
 приблизительно до 0,08 мг/кг, приблизительно от 0,04 мг/кг
 приблизительно до 0,07 мг/кг, приблизительно от 0,04 мг/кг
 приблизительно до 0,06 мг/кг, приблизительно от 0,05 мг/кг
 приблизительно до 0,5 мг/кг, приблизительно от 0,05 мг/кг
 приблизительно до 0,4 мг/кг, приблизительно от 0,05 мг/кг
 приблизительно до 0,3 мг/кг, приблизительно от 0,05 мг/кг
 приблизительно до 0,2 мг/кг, приблизительно от 0,05 мг/кг
 приблизительно до 0,1 мг/кг, приблизительно от 0,05 мг/кг
 приблизительно до 0,09 мг/кг, приблизительно от 0,05 мг/кг
 приблизительно до 0,08 мг/кг или приблизительно от 0,05 мг/кг
 приблизительно до 0,07 мг/кг. Значения и диапазоны между
 приведенными выше указанными значениями также предназначены в
 качестве части данного изобретения, например, РНКи средство
 можно вводить субъекту в дозе приблизительно от 0,015 мг/кг
 приблизительно до 0,45 мг/кг.

Например, РНКи средство, например, РНКи средство в
 фармацевтической композиции, можно вводить в дозе приблизительно
 0,01 мг/кг, 0,0125 мг/кг, 0,015 мг/кг, 0,0175 мг/кг, 0,02 мг/кг,
 0,0225 мг/кг, 0,025 мг/кг, 0,0275 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,0325
 мг/кг, 0,035 мг/кг, 0,0375 мг/кг, 0,04 мг/кг, 0,0425 мг/кг,
 0,045 мг/кг, 0,0475 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,0525 мг/кг, 0,055
 мг/кг, 0,0575 мг/кг, 0,06 мг/кг, 0,0625 мг/кг, 0,065 мг/кг,
 0,0675 мг/кг, 0,07 мг/кг, 0,0725 мг/кг, 0,075 мг/кг, 0,0775
 мг/кг, 0,08 мг/кг, 0,0825 мг/кг, 0,085 мг/кг, 0,0875 мг/кг, 0,09
 мг/кг, 0,0925 мг/кг, 0,095 мг/кг, 0,0975 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,125
 мг/кг, 0,15 мг/кг, 0,175 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,225 мг/кг, 0,25
 мг/кг, 0,275 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,325 мг/кг, 0,35 мг/кг, 0,375
 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,425 мг/кг, 0,45 мг/кг, 0,475 мг/кг или
 приблизительно 0,5 мг/кг. Значения между приведенными выше
 указанными значениями также предназначены в качестве части
 данного изобретения.

Фармацевтическую композицию можно вводить посредством
 внутривенной инфузии в течение определенного периода времени,
 например, в течение периода в 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,
 15, 16, 17, 18, 19, 20, и 21, 22, 23, 24 или приблизительно 25

минут. Введение можно повторять, например, на регулярной основе, например, раз в неделю, раз в две недели (т. е., каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше. После начальной схемы лечения, лечение можно вводить на менее частой основе. Например, после введения раз в неделю или раз в две недели в течение трех месяцев, введение можно повторять один раз в месяц, в течение шести месяцев или года или дольше.

Фармацевтическую композицию можно вводить посредством подкожного введения.

Фармацевтическую композицию можно вводить один раз в сутки или иРНК можно вводить в виде двух, трех или больше частичных доз в подходящие интервалы на всем протяжении суток или даже используя непрерывную инфузию или доставку через состав с контролируемым высвобождением. В этом случае иРНК, содержащаяся в каждой частичной дозе, должна быть соответственно меньше, чтобы достигать общей ежедневной дозы. Единицу дозирования также можно компаундировать для доставки в течение нескольких сток, например, с использованием стандартного состава с замедленным высвобождением, который обеспечивает замедленное высвобождение иРНК в течение периода в несколько суток. Составы с замедленным высвобождением хорошо известны в данной области и, в частности, их можно использовать для доставки средств в конкретное место, например, можно использовать со средствами по настоящему изобретению. В этом варианте осуществления единица дозирования содержит соответствующее кратное число суточных доз. Изначально можно вводить более высокую дозу (т. е., загрузочную дозу), после чего следует более низкая доза в течение длительного периода времени.

В других вариантах осуществления однократная доза фармацевтических композиций может быть долгосрочной, так что последующие дозы вводят с интервалами больше чем 3, 4 или 5 суток или с интервалами не больше чем 1, 2, 3 или 4 недели. В некоторых вариантах осуществления изобретения, однократную дозу фармацевтических композиций по изобретению вводят один раз в неделю. В других вариантах осуществления изобретения однократную

дозу фармацевтических композиций по изобретению вводят раз в два месяца. В определенных вариантах осуществления иРНК вводят приблизительно от одного раза в месяц приблизительно до одного раза в квартал (т. е., приблизительно один раз через три месяца).

Фармацевтическую композицию можно вводить в течение неопределенного периода времени, например, субъекту с повышенным кровяным давлением из-за ожирения, или в течение времени, когда причинная повышенного уровня АГТ имеет место, например, во время высокого кровяного давления, вызванного беременностью.

Специалист в данной области примет во внимание, что определенные факторы могут влиять на дозу и время, необходимые для эффективного лечения субъекта, включая в качестве неограничивающих примеров тяжесть заболевания или нарушения, предыдущее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие присутствующие заболевания. Кроме того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством композиции может включать единственное лечение или серийное лечение. Оценки эффективных доз и время полужизни *in vivo* для отдельных иРНК, охватываемых изобретением, можно выполнять с использованием стандартных способов или на основании тестирования *in vivo*, используя подходящую животную модель, как описано в другом месте в настоящем документе.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить с использованием множества путей, в зависимости от того, локальное или системное лечение является желаемым, а также от области, подлежащей лечению. Введение может быть топическим (например, посредством трансдермального пластыря), легочным, например, посредством ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе, с помощью небулайзера; интратрахеальным, интраназальным, эпидермальным и трансдермальным, оральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенные, внутриартериальные, подкожные, интраперитонеальные или внутримышечные инъекции или инфузии; субдермальное, например, через имплантированное устройство; или внутричерепное, например, посредством интрапаренхимального, интратекального или

внутрижелудочкового, введения.

иРНК можно доставлять в определенном смысле в конкретную целевую ткань, такую как печень (например, гепатоциты печени).

Фармацевтические композиции и составы для топического введения могут включать трансдермальные пластыри, мази, примочки, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Стандартные фармацевтические носители, водные, порошковые или масляные основы, загустители и т. п. могут быть необходимыми или желательными. Покрытые кондомы, перчатки и т. п. также можно использовать. Подходящие топические составы включают те, в которых иРНК по изобретению смешаны со средством топической доставки, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие средства и поверхностно-активные средства. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеоилфосфатидил DOPC этаноламин, димиристоилфосфатидилхолин DMPC, дистеароилфосфатидилхолин) отрицательные (например, димиристоилфосфатидилглицерин DMPG) и катионные (например, диолеоилтетраметиламинопропил DOTAP и диолеоилфосфатидилэтанолламин DOTMA). иРНК по изобретению можно инкапсулировать внутри липосом или они могут формировать комплексы с ними, в частности, с катионными липосомами. Альтернативно, иРНК могут образовывать комплексы с липидами, в частности, с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают, но не ограничиваясь этим, арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту, эйкозановую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или сложный эфир C₁₋₂₀ алкила (например, изопропилмириститат IPM), моноглицерид, диглицерид или его фармацевтически приемлемую соль). Топические составы описаны подробно в патенте США № 6747014, включенном в настоящий документ посредством ссылки.

А. Составы иРНК, содержание мембранные молекулярные

ассоциаты

иРНК для использования в композициях и способах по изобретению можно формулировать для доставки в мембранный молекулярный ассоциат, например, липосомы или мицеллы. Как используют в настоящем документе, термин «липосома» относится к везикуле, состоящей из амфифильных липидов, расположенных по меньшей мере одним бислоем, например, одним бислоем или множеством бислоев. Липосомы включают однослойные и многослойные везикулы, которые имеют мембрану, сформированную из липофильного материала, и водную внутреннюю часть. Водная часть содержит композицию иРНК. Липофильный материал изолирует водную внутреннюю часть от водного окружения, которое типично не содержит композицию иРНК, несмотря на то, что в некоторых примерах может. Липосомы можно использовать для транспортировки и доставки активных ингредиентов к месту приложения действия. Поскольку липосомная мембрана структурно схожа с биологическими мембранами, когда липосомы применяют к ткани, липосомный бислой сливается с бислоем клеточных мембран. По мере слияния липосомы и клетки, внутреннее водное содержимое, которое содержит иРНК, доставляют в клетку, где иРНК может специфично связываться с целевой РНК и может опосредовать иРНК. В некоторых случаях липосомы также являются специфично направленными, например, для того, чтобы направлять иРНК в клетки конкретных типов.

Липосому, содержащую иРНК средство, можно получать различными способами. В одном из примеров липидный компонент липосомы растворяют в детергенте с тем, чтобы формировать мицеллы с липидным компонентом. Например, липидный компонент может представлять собой амфипатический катионный липид или липидный конъюгат. Детергент может иметь высокую критическую концентрацию мицелл и может быть неионным. Образцовые детергенты включают холат, CHAPS, октилглюкозид, дезоксихолат и лауроилсаркозин. Затем препарат иРНК средства добавляют к мицеллам, которые содержат липидный компонент. Катионные группы на липиде взаимодействуют с иРНК средством и конденсируются вокруг иРНК средства для того, чтобы формировать липосому. После конденсации детергент удаляют, например, посредством диализа,

чтобы получать липосомный препарат иРНК средства.

В случае необходимости, соединение носителя, которое содействует конденсации, можно добавлять во время реакции конденсации, например, посредством контролируемого добавления. Например, соединение носителя может представлять полимер, отличный от нуклеиновой кислоты (например, спермин или спермидин). Также можно корректировать рН, чтобы содействовать конденсации.

Способы получения стабильных переносчиков для доставки полинуклеотидов, которые содержат комплекс полинуклеотид/катионный липид в качестве структурных компонентов переносчика для доставки, дополнительно описаны, например, в WO 96/37194, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Формирование липосом также может включать один или несколько аспектов образцовых способов, описанных в Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987; патенте США № 4897355; патенте США № 5171678; Bangham, et al. M. Mol. Biol. 23:238, 1965; Olson, et al. Biochim. Biophys. Acta 557:9, 1979; Szoka, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4194, 1978; Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984; Kim, et al. Biochim. Biophys. Acta 728:339, 1983; и Fukunaga, et al. Endocrinol. 115:757, 1984. Широко используемые способы получения липидных агрегатов подходящего размера для применения в качестве переносчиков для доставки включают обработку ультразвуком и замораживание-оттаивание плюс экструзия (см., например, Mayer, et al. Biochim. Biophys. Acta 858:161, 1986). Микрофлюидизацию можно использовать, когда желательны согласованные небольшие (от 50 до 200 нм) и относительно однородные агрегаты (Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984). Эти способы уже адаптированы для упаковки препаратов иРНК средств в липосомы.

Липосомы попадают в два широких класса. Катионные липосомы представляют собой положительно заряженные липосомы, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновой кислоты для того, чтобы формировать стабильный комплекс. Комплекс Положительно заряженный комплекс нуклеиновой

кислоты/липосомы связывается с отрицательно заряженной клеточной поверхностью и интернализируются в эндосоме. Из-за кислого pH внутри эндосомы происходит разрыв липосом, высвобождение их содержимого в цитоплазму клетки (Wang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147:980-985).

Липосомы, которые чувствительны к pH или отрицательно заряжены, захватывают нуклеиновые кислоты вместо того, чтобы образовывать комплекс с ними. Поскольку и нуклеиновая кислота и липид заряжены одинаково, то вместо формирования комплекса происходит отталкивание. Тем не менее, происходит захват некоторых нуклеиновых кислот в водной внутренней части этих липосом. Липосомы, чувствительные к pH, использовали для того, чтобы доставлять нуклеиновые кислоты, кодирующие ген тимидинкиназы, в монослой клеток в культуре. Экспрессию экзогенного гена обнаруживали в целевых клетках (Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

Один основной тип липосомной композиции содержит фосфолипиды, отличные от фосфатидилхолина естественного происхождения. Нейтральные липосомные композиции, например, можно формировать из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Анионные липосомные композиции в целом формируют из димиристоилфосфатидилглицерина, тогда как анионные фузогенные липосомы формируют в первую очередь из диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Липосомную композицию другого типа формируют из фосфатидилхолина (PC), например, такого как PC соевых бобов и яичный PC. Другой тип формируют из смесей фосфолипида и/или фосфатидилхолина и/или холестерина.

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

Также исследовали неионные липосомные системы для того, чтобы определять их полезность при доставке лекарственных

средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионное поверхностно-активное средство и холестерин. Неионные липосомные составы, содержащие Novasome™ I (глицерилдилаурат/холестерин/простой полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome™ II (глицерилдистеарат/холестерин/простой полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) использовали для того, чтобы доставлять циклоспорин А в дермис кожи мыши. Результаты показывали, что такие неионные липосомные системы эффективно содействуют отложению циклоспорина А в различных слоях кожи (Hu et al. S.T.P. Pharma. Sci., 1994, 4(6) 466).

Липосомы также включают «стерически стабилизированные» липосомы, этот термин, как используют в настоящем документе, относится к липосомам, содержащим один или несколько специализированных липидов, которые при встраивании в липосомы приводят к увеличенному времени жизни в циркуляции относительно липосом, не содержащих такие специализированные липиды. Примерами стерически стабилизированных липосом являются те, в которых часть липидной порции липосомы, формирующей везикулу, (А) содержит один или несколько гликолипидов, таких как моносиалоганглиозид GM1, или (В) является производным, полученным с использованием одного или нескольких гидрофильных полимеров, таких как фрагмент полиэтиленгликоля (PEG). Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, в данной области полагают, что по меньшей мере для стерически стабилизированных липосом, содержащих ганглиозиды, сфингомиелин или PEG-производные липиды, увеличенное время полужизни в циркуляции у этих стерически стабилизированных липосом проистекает из сниженного накопления в клетках ретикулоэндотелиальной системы (RES) (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

В данной области известны различные липосомы, содержащие один или несколько гликолипидов, . Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) сообщали о способности моносиалоганглиозида GM1, галактоцереброзид сульфата и фосфатидилинозитола усовершенствовать время полужизни липосом в

крови. Эти находки прокомментированы в Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). В патенте США № 4837028 и WO 88/04924, оба Allen et al., раскрыты липосомы, которые содержат (1) сфингомиелин и (2) ганглиозид GM1 или сложный эфир галактоцеребозид сульфата. В патенте США № 5543152 (Webb et al.) раскрыты липосомы, которые содержат сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn-димиристоилфосфатидилхолин, раскрыты в WO 97/13499 (Lim et al).

В одном из вариантов осуществления используют катионные липосомы. Катионные липосомы обладают таким преимуществом, что способны сливаться с клеточной мембраной. Некатионные липосомы, несмотря на то, что не способны эффективно сливаться с плазматической мембраной, захватываются макрофагами *in vivo*, и это можно использовать для того, чтобы доставлять иРНК средства в макрофаги.

Дополнительные преимущества липосом включают: липосомы, полученные из природных фосфолипидов, являются биологически совместимыми и биоразрушаемыми; в липосомы можно встраивать широкий диапазон водо- и липидорастворимых лекарственных средств; липосомы могут защищать инкапсулированные иРНК средства в своих внутренних компартментах от метаболизма и деградации (Rosoff, в «Pharmaceutical Dosage Forms», под редакцией Lieberman, Rieger and Banker, 1988, том 1, стр. 245). Важными факторами при получении липосомных составов являются поверхностный заряд липида, размер везикулы и объем воды в липосомах.

Положительно заряженный синтетический катионный липид, N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмоний хлорид (DOTMA) можно использовать для того, чтобы формировать небольшие липосомы, которые самопроизвольно взаимодействуют с нуклеиновой кислотой для того, чтобы формировать комплексы липид-нуклеиновая кислота, которые способны сливаться с отрицательно заряженными липидами клеточных мембран клеток культуры ткани, что ведет к доставке иРНК средства (описание DOTMA и его использование с ДНК см., например, в Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987 и патенте США № 4897355).

DOTMA аналог, 1,2-бис(олеоилокси)-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP) можно использовать в комбинации с фосфолипидом для того, чтобы формировать ДНК-комплексобразующие везикулы. Липофектин™ Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md. представляет собой эффективное средство для доставки резко анионных нуклеиновых кислот в клетки живой культуры ткани, которое содержит положительно заряженные DOTMA липосомы, которые самопроизвольно взаимодействуют с отрицательно заряженными полинуклеотидами для того, чтобы формировать комплексы. Когда используют липосомы, заряженные достаточно положительно, суммарный заряд на получаемых комплексах также является положительным. Положительно заряженные комплексы, полученные таким образом, самопроизвольно прикрепляются к отрицательно заряженным клеточным поверхностям, сливаются с плазматической мембраной и эффективно доставляют функциональные нуклеиновые кислоты, например, в клетки культуры ткани. Другой коммерчески доступный катионный липид, 1,2-бис(олеоилокси)-3,3-(триметиламмоний)пропан («DOTAP») (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) отличается от DOTMA тем, что фрагменты олеоида связаны с помощью сложноэфирных связей вместо простых эфирных.

Другие опубликованные соединения катионных липидов включают те, которые конъюгировали с различными фрагментами, включая, например, карбоксиспермин, который конъюгировали с липидами одного из двух типов и включает соединения, такие как 5-карбоксиспермилглициндиоктаолеоиламид («DOGS») (Transfectam™, Promega, Madison, Wisconsin) и дипальмитоилфосфатидилэтаноламин 5-карбоксиспермил-амид («DPPES») (см., например, патент США № 5171678).

Другой катионный липидный конъюгат включает получение производных липида с использованием холестерина («DC-Chol»), который формулировали в липосомы в комбинации с DOPE (см., Gao, X. and Huang, L., Biochim. Biophys. Res. Commun. 179:280, 1991). Сообщалось, что липополизин, полученный посредством конъюгации полилизина с DOPE, эффективен для трансфекции в присутствии

сыворотки (Zhou, X. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8, 1991). Для определенных клеточных линий указано, что эти липосомы, содержащие коъюгированные катионные липиды, проявляют более низкую токсичность и обеспечивают более эффективную трансфекцию, чем DOTMA-содержащие композиции. Другие коммерчески доступные продукты катионных липидов включают DMRIE и DMRIE-HP (Vical, La Jolla, California) и липофектамин (DOSPA) (Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland). Другие катионные липиды, подходящие для доставки олигонуклеотидов, описаны в WO 98/39359 и WO 96/37194.

Липосомные составы в частности подходят для топического введения, липосомы представляют несколько преимуществ над другими составами. Такие преимущества включают сниженные побочные эффекты, связанные с высокой системной абсорбцией введенного лекарственного средства, увеличенное накопление введенного лекарственного средства в желаемой мишени и способность вводить иРНК средство в кожу. В некоторых реализациях липосомы используют для доставки иРНК средства в клетки эпидермиса и также для увеличения проникновения иРНК средства в дермальные ткани, например, в кожу. Например, липосомы можно применять топически. Топическая доставка лекарственных средств, сформулированных в виде липосом, в кожу задокументирована (см., например, Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, том 2, 405-410, и du Plessis et al., *Antiviral Research*, 18, 1992, 259-265; Mannino, R. J. and Fould-Fogerite, S., *Biotechniques* 6:682-690, 1988; Itani, T. et al. *Gene* 56:267-276, 1987; Nicolau, C. et al. *Meth. Enz.* 149:157-176, 1987; Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. *Meth. Enz.* 101:512-527, 1983; Wang, C. Y. and Huang, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855, 1987).

Неионные липосомные системы также исследовали для того, чтобы определять их полезность при доставке лекарственных средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионное поверхностно-активное средство и холестерин. Неионные липосомные составы, содержащие Novasome I (глицерилдилаурат/холестерин/простой полиоксиэтилен-10-

стеариловый эфир) и Novasome II (глицерилдистеарат/холестерин/простой полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) использовали для того, чтобы доставлять лекарственное средство в дерму кожи мыши. Такие составы с иРНК средством можно использовать для лечения дерматологического нарушения.

Липосомы, которые содержат иРНК, можно делать высоко деформируемыми. Такая способность к деформации может позволять липосомам проикать через поры, которые меньше, чем усредненный радиус липосомы. Например, трансферсомы представляют собой тип деформируемых липосом. Трансферсомы можно получать посредством добавления активаторы краев поверхности, обычно поверхностно-активные средства, в стандартную липосомную композицию. Трансферсомы, которые содержат иРНК средство, можно доставлять, например, подкожно посредством инъекции, чтобы доставлять иРНК средство в кератиноциты в коже. Чтобы пересечь интактную кожу млекопитающего, липидные везикулы должны пройти через ряд мелких пор, каждая диаметром меньше 50 нм, под влиянием подходящего трансдермального градиента. Кроме того, из-за свойств липидов эти трансферсомы могут быть самооптимизирующимися (адаптирующимися к геометрической форме пор, например, в коже), самовосстанавливающимися и часто могут достигать своей цели без фрагментации, и часто самонагружающимися.

Другие составы, пригодные для настоящего изобретения, описаны в предварительных заявках США с серийными №№ 61/018,616, которая подана 2 января 2008 года; 61/018,611, которая подана 2 января 2008 года; 61/039,748, которая подана 26 марта 2008 года; 61/047,087, которая подана 22 апреля 2008 года и 61/051,528, которая подана 8 мая 2008 года. Заявка РСТ № РСТ/US2007/080331, которая подана 3 октября 2007 года, также описывает составы, которые пригодны для настоящего изобретения.

Трансферсомы представляют собой еще один другой тип липосом и представляют собой высоко деформируемые липидные агрегаты, которые являются привлекательными кандидатами в носители для доставки лекарственных средств. Трансферсомы можно описать как липидные капельки, которые являются настолько высоко

деформируемыми, что они могут легко проникать через поры, которые меньше, чем капелька. Трансферсомы являются адаптируемыми к среде, в которой их используют, например, они являются самооптимизирующимися (адаптирующимися к геометрической форме пор в коже), самовосстанавливающимися, часто достигают своих целей без фрагментации и часто самонагружаются. Для получения трансферсомможно добавлять активаторы краев поверхности, обычно поверхностно-активные средства, в стандартную липосомную композицию. Трансферсомы использовали для того, чтобы доставлять сывороточный альбумин в кожу. Показано, что опосредованная трансферсомами доставка сывороточного альбумина так же эффективна, как подкожная инъекция раствора, содержащего сывороточный альбумин.

Поверхностно-активные средства находят широкое применение в составах, таких как эмульсии (в том числе микроэмульсии) и липосомы. Наиболее распространенный путь классификации и ранжирования свойств поверхностно-активных средств многих различных типов, как природных, так и синтетических, основан на гидрофильном/липофильном балансе (HLB). Свойства гидрофильной группы (также известный как «голова») предоставляют наиболее эффективное средство для категоризации различных поверхностно-активных средств, используемых в составах (Rieger, в «Pharmaceutical Dosage Forms», Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, стр. 285).

Если молекула поверхностно-активного средства не ионизирована, ее классифицируют в качестве неионного поверхностно-активного средства. Неионные поверхностно-активные средства находят широкое применение в фармацевтических и косметических продуктах, и их можно использовать в широком диапазоне значений pH. В целом, их значения HLB находятся в диапазоне от 2 приблизительно до 18 в зависимости от их структуры. Неионные поверхностно-активные средства включают неионные сложные эфиры, такие как сложные эфиры этиленгликоля, сложные эфиры пропиленгликоля, сложные эфиры глицерила, сложные эфиры полиглицерила, сложные эфиры сорбитана, сложные эфиры сахарозы и этоксилированные сложные эфиры. Неионные алканоламиды

и простые эфиры, такие как этоксилаты жирных спиртов, пропоксилированные спирты и этоксилированные/пропоксилированные блок-полимеры также включены в этот класс. Полиоксиэтиленовые поверхностно-активные средства являются наиболее популярными элементами класса неионных поверхностно-активных средств.

Если молекула поверхностно-активного средства несет отрицательный заряд, когда ее растворяют или диспергируют в воде, поверхностно-активное средство классифицируют как анионное. Анионные поверхностно-активные средства включают карбоксилаты, такие как мыла, ациллактилаты, ациламины аминокислот, сложные эфиры серной кислоты, такие как алкилсульфаты и этоксилированные алкилсульфаты, сульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты, ацилизетионаты, ацилтаураты и сульфосукцинаты и фосфаты. Наиболее важными элементами класса анионных поверхностно-активных средств являются алкилсульфаты и мыла.

Если молекула поверхностно-активного средства несет положительный заряд, когда ее растворяют или диспергируют в воде, поверхностно-активное средство классифицируют как катионное. Катионные поверхностно-активные средства включают четвертичные аммониевые соли и этоксилированные амины. Четвертичные аммониевые соли являются наиболее используемыми элементами этого класса.

Если молекула поверхностно-активного средства обладает способностью нести или положительный или отрицательный заряд, поверхностно-активное средство классифицируют как амфотерное. Амфотерные поверхностно-активные средства включают производные акриловой кислоты, замещенные алкиламины, N-алкилбетаины и фосфатиды.

Использование поверхностно-активных средств в лекарственных продуктах, составах и эмульсиях рассмотрено у Rieger, в «Pharmaceutical Dosage Forms», Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, стр. 285).

иРНК для использования в способах по изобретению также можно предоставлять в виде мицеллярных составов. «Мицеллы» определяют в настоящем документе как молекулярный ассоциат

конкретного типа, в котором амфипатические молекулы образуют сферическую структуру так, что все гидрофобные части молекулы направлены внутрь, оставляя гидрофильные части в контакте с окружающей водной фазой. Обратное расположение имеет место, если среда является гидрофобной.

Смешанный мицеллярный состав, подходящий для доставки через трансдермальные мембраны, можно получать посредством смешивания водного раствора композиции миРНК, C_8 - C_{22} алкилсульфата щелочного металла и образующих мицеллы соединений. Образцовые образующие мицеллы соединения включают лецитин, гиалуроновую кислоту, фармацевтически приемлемые соли гиалуроновой кислоты, гликолевую кислоту, молочную кислоту, экстракт ромашки, экстракт огурца, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, моноолеин, моноолеаты, монолаураты, масло бурачника, масло энотеры, ментол, тригидроксиоксохоланилглицин и его фармацевтически приемлемые соли, глицерин, полиглицерин, лизин, полилизин, триолеин, простые эфиры полиоксиэтилена и их аналоги, простые алкиловые эфиры полидоканола и их аналоги, хенодезоксихолат, дезоксихолат и их смеси. Образующие мицеллы соединения можно добавлять одновременно или после добавления алкилсульфата щелочного металла. Смешанные мицеллы будут формироваться при по существу любом типе смешивания ингредиентов, кроме энергичного смешивания для того, чтобы предоставить мицеллы меньшего размера.

В одном способе получают первую мицеллярную композицию, которая содержит композицию миРНК и по меньшей мере алкилсульфат щелочного металла. Затем первую мицеллярную композицию смешивают по меньшей мере с тремя образующими мицеллы соединениями для того, чтобы формировать смешанную мицеллярную композицию. В другом способе мицеллярную композицию получают посредством смешивания композиции миРНК, алкилсульфата щелочного металла и по меньшей мере одного из образующих мицеллы соединений, после чего следует добавление остальных образующих мицеллы соединений, при энергичном перемешивании.

Фенол и/или м-крезол можно добавлять в смешанную мицеллярную композицию для того, чтобы стабилизировать состав и

обеспечивать защиту от бактериального роста. Альтернативно, фенол и/или м-крезол можно добавлять с образующими мицеллы ингредиентами. Изотоническое средство, такое как глицерин, также можно добавлять после формирования смешанной мицеллярной композиции.

Для доставки мицеллярного состава в виде спрея, состав можно помещать в дозатор аэрозоля и заряжать дозатор пропеллентом. Пропеллент, который находится под давлением, находится в дозаторе в жидкой форме. Соотношения ингредиентов корректируют с тем, чтобы водная фаза и фаза пропеллента образовывали единое, т. е., имеет место одна фаза. Если имеют место две фазы, необходимо встряхивать дозатор перед дозированием части содержимого, например, через мерный клапан. Дозированную дозу фармацевтического средства выталкивают из мерного клапана в виде мелкого спрея.

Пропелленты могут включать водород-содержащие хлорфторуглероды, водород-содержащие фторуглероды, простой диметиловый эфир и простой диэтиловый эфир. В определенных вариантах осуществления можно использовать HFA 134a (1,1,1,2-тетрафторэтан).

Конкретные концентрации важных ингредиентов можно определять посредством относительно простых экспериментов. Для абсорбции через ротовую полость часто желательно повышать, например, по меньшей мере в два или три раза, дозу для инъекционного введения или введения через желудочно-кишечный тракт.

В. Липидные частицы

иРНК, например, дцРНК по изобретению, можно полностью инкапсулировать в липидный состав, например, LNP, или другие частицы нуклеиновая кислота-липид.

Как используют в настоящем документе, термин «LNP» относится к стабильной частице нуклеиновая кислота-липид. LNP типично содержат катионный липид, некатионный липид и липид, который предотвращает агрегирование частиц (например, PEG-липидный конъюгат). LNP чрезвычайно эффективны для системного применения, поскольку они проявляют увеличенное время полужизни

в циркуляции после внутривенной (i.v.) инъекции и накапливают в удаленных местах (например, местах, физически отделенных от места введения). LNP включают «pSPLP», которые включают инкапсулированный комплекс конденсирующее средство-нуклеиновая кислота, как изложено в публикации PCT № WO 00/03683. Частицы по настоящему изобретению типично имеют средний диаметр приблизительно от 50 нм приблизительно до 150 нм, более типично приблизительно от 60 нм приблизительно до 130 нм, более типично приблизительно от 70 нм приблизительно до 110 нм, наиболее типично приблизительно от 70 нм приблизительно до 90 нм и по существу являются нетоксичными. Кроме того, нуклеиновые кислоты, когда присутствуют в частицах нуклеиновая кислота-липид по настоящему изобретению, устойчивы в водном растворе к деградации нуклеазами. Частицы нуклеиновая кислота-липид и способ их получения раскрыты, например, в патентах США №№ 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; публикации США № 2010/0324120 и публикации PCT № WO 96/40964.

В одном из вариантов осуществления соотношение липида и лекарственного средства (соотношение масса/масса) (например, соотношение липида и дцРНК) будет в диапазоне приблизительно от 1:1 приблизительно до 50:1, приблизительно от 1:1 приблизительно до 25:1, приблизительно от 3:1 приблизительно до 15:1, приблизительно от 4:1 приблизительно до 10:1, приблизительно от 5:1 приблизительно до 9:1 или приблизительно 6:1 приблизительно до 9:1. Диапазоны между приведенными выше диапазонами также предусмотрены в качестве части изобретения.

Катионный липид может представлять собой, например, N,N-диолеил-N,N-диметиламмоний хлорид (DODAC), N,N-дистеарил-N,N-диметиламмоний бромид (DDAB), N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмоний хлорид (DOTAP), N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмоний хлорид (DOTMA), N,N-диметил-2,3-диолеилокси)пропиламин (DODMA), 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLenDMA), 1,2-дилинолеилкарбамоилокси-3-диметиламинопропан (DLin-C-DAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(диметиламино)ацетоксипропан (DLin-DAC), 1,2-дилинолеилокси-3-

морфолинопропан (DLin-MA), 1,2-дилинолеил-3-диметиламинопропан (DLinDAP), 1,2-дилинолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-линолеил-2-линолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMAP), соль 1,2-дилинолеилокси-3-триметиламинопропанхлорида (DLin-TMA.Cl), соль 1,2-дилинолеил-3-триметиламинопропанхлорида (DLin-TAP.Cl), 1,2-дилинолеилокси-3-(N-метилпиперазино)пропан (DLin-MPZ) или 3-(N,N-дилинолеиламино)-1,2-пропандиол (DLinAP), 3-(N,N-диолеиламино)-1,2-пропандиол (DOAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(2-N,N-диметиламино)этоксипропан (DLin-EG-DMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA) или их аналоги, (3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100), (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазанедиил)дидодекан-2-ол (Tech G1) или их смесь. Катионный липид может содержать приблизительно от 20 моль% приблизительно до 50 моль% или приблизительно 40 моль% от всех липидов, присутствующих в частице.

В другом варианте осуществления соединение 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан можно использовать для того, чтобы получать наночастицы липид-миРНК. Синтез 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана описан в предварительной патентной заявке США № 61/107,998, поданной 23 октября 2008 года, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

В одном из вариантов осуществления частица липид-миРНК содержит 40% 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана: 10% DSPC:40% холестерина: 10% PEG-C-DOMG (мольные проценты) с размером частицы $63,0 \pm 20$ нм и соотношением миРНК/липид 0,027.

Ионизируемый/некатионный липид может представлять собой анионный липид или нейтральный липид, включая в качестве неограничивающих примеров дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин

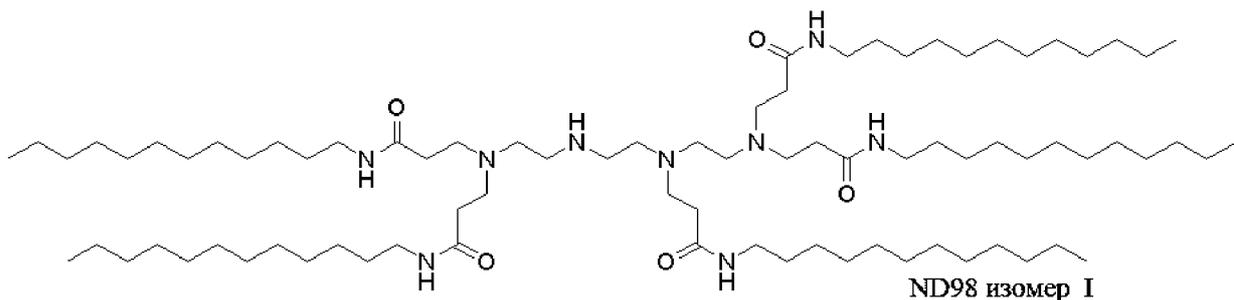
(DPPC), диолеилфосфатидилглицерин (DOPG),
 дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG),
 диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE),
 пальмитоилолеилфосфатидилхолин (POPC),
 пальмитоилолеилфосфатидилэтаноламин (POPE),
 диолеилфосфатидилэтаноламин 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-
 карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE),
 димиристоилфосфоэтаноламин (DMPE),
 дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), 16-О-монометил PE, 16-О-
 диметил PE, 18-1-транс PE, 1-стеароил-2-
 олеилфосфатидиэтаноламин (SOPE), холестерин или их смесь.
 Некатионный липид может составлять приблизительно от 5 моль%
 приблизительно до 90 моль%, приблизительно 10 моль% или
 приблизительно 58 моль%, если холестерин включен, от всех
 липидов, присутствующих в частице.

Конъюгированный липид, который ингибирует агрегирование
 частиц, может представлять собой, например, полиэтиленгликоль
 (PEG)-липид, включая, без ограничения, PEG-диацилглицерин (DAG),
 PEG-диалкилоксипропил (DAA), PEG-фосфолипид, PEG-церамид (Cer)
 или их смесь. Конъюгат PEG-DAA может представлять собой,
 например, PEG-дилаурилоксипропил (C₁₂), PEG-димиристилоксипропил
 (C₁₄), PEG-дипальмитилоксипропил (C₁₆) или PEG-
 дистеарилоксипропил (C₁₈). Конъюгированный липид, который
 предотвращает агрегирование частиц, может составлять от 0 моль%
 приблизительно до 20 моль% или приблизительно 2 моль% от всех
 липидов, присутствующих в частице.

В некоторых вариантах осуществления частица нуклеиновая
 кислота-липид дополнительно содержит холестерин, например,
 приблизительно от 10 моль% приблизительно до 60 моль% или
 приблизительно 48 моль% от всех липидов, присутствующих в
 частице.

В одном из вариантов осуществления липидоид ND98·4HCl (MW
 1487) (см. патентную заявку США № 12/056,230, поданную 26 марта
 2008 года, включенную в настоящий документ посредством ссылки),
 холестерин (Sigma-Aldrich) и PEG-церамид C16 (Avanti Polar

Lipids) можно использовать для того, чтобы получать наночастицы липид-дцРНК (т. е., частицы LNP01). Стоковые растворы каждого в этаноле можно получать следующим образом: ND98, 133 мг/мл; холестерин, 25 мг/мл, PEG-церамид C16, 100 мг/мл. Затем стоковые растворы ND98, холестерин и PEG-церамид C16 можно объединять, например, в молярном соотношении 42:48:10. Объединенный липидный раствор можно смешивать с водной дцРНК (например, в ацетате натрия pH 5) так, что конечная концентрация этанола составляет приблизительно 35-45% и конечная концентрация ацетата натрия составляет приблизительно 100-300 мМ. Наночастицы липид-дцРНК типично образуются самопроизвольно при смешивании. В зависимости от желаемого распределения размеров частиц, получаемую смесь наночастиц можно экструдировать через поликарбонатную мембрану (например, с порогом 100 нм), используя, например, экструдер Thermobarrel, такой как Lipex Extruder (Northern Lipids, Inc). В некоторых случаях, стадию экструзии можно опускать. Удаление этанола и одновременную замену буфера можно выполнять посредством, например, диализа или тангенциального поточного фильтрования. Буфер можно обменивать, например, с фосфатно-солевым буфером (PBS) при приблизительно pH 7, например, приблизительно pH 6,9, приблизительно pH 7,0, приблизительно pH 7,1, приблизительно pH 7,2, приблизительно pH 7,3 или приблизительно pH 7,4.



Формула 1

LNP01 составы описаны, например, в публикации международной заявки № WO 2008/042973, которая, таким образом, включена посредством ссылки.

Дополнительные образцовые составы липид-дцРНК описаны в таблице 1.

Таблица 1

	Ионизируемый/катионный липид	Катионный липид/некатионный липид/холестерин/PEG- липидный конъюгат Соотношение липид:миРНК
SNALP-1	1,2-дилиноленилокси-N,N- диметиламинопропан (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/холестерин/PE G-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) липид:миРНК ~ 7:1
2-ХТС	2,2-дилинолеил-4- диметиламиноэтил-[1,3]- диоксолан (ХТС)	ХТС/DPPC/холестерин/PEG- cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 липид:миРНК ~ 7:1
LNP05	2,2-дилинолеил-4- диметиламиноэтил-[1,3]- диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG- DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:миРНК ~ 6:1
LNP06	2,2-дилинолеил-4- диметиламиноэтил-[1,3]- диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG- DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:миРНК ~ 11:1
LNP07	2,2-дилинолеил-4- диметиламиноэтил-[1,3]- диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG- DMG 60/7,5/31/1,5, липид:миРНК ~ 6:1
LNP08	2,2-дилинолеил-4- диметиламиноэтил-[1,3]- диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG- DMG 60/7,5/31/1,5, липид:миРНК ~ 11:1
LNP09	2,2-дилинолеил-4- диметиламиноэтил-[1,3]- диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG- DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК 10:1
LNP10	(3aR, 5s, 6aS)-N,N-диметил- 2,2-ди((9Z, 12Z)-октадека- 9,12-диенил) тетрагидро- 3aH- циклопента [d] [1,3] диоксол- 5-амин (ALN100)	ALN100/DSPC/холестерин/PEG -DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК 10:1
LNP11	(6Z, 9Z, 28Z, 31Z)- гептатриаконта-6,9,28,31-	MC-3/DSPC/холестерин/PEG- DMG 50/10/38,5/1,5

	тетраен-19-ил (диметиламино) бутаноат (МС3)	4- липид:миРНК 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2- гидроксидодецил) амино) этил) (2- гидроксидодецил) амино) этил) пиперазин-1- ил) этилазандиил) дидодекан- 2-ол (Tech G1)	Tech G1/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК 10:1
LNP13	ХТС	ХТС/DSPC/холестерин/PEG- DMG 50/10/38.5/1.5 липид:миРНК: 33:1
LNP14	МС3	МС3/DSPC/холестерин/PEG- DMG 40/15/40/5 липид:миРНК: 11:1
LNP15	МС3	МС3/DSPC/холестерин/PEG- DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 липид:миРНК: 11:1
LNP16	МС3	МС3/DSPC/холестерин/PEG- DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК: 7:1
LNP17	МС3	МС3/DSPC/холестерин/PEG- DSG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК: 10:1
LNP18	МС3	МС3/DSPC/холестерин/PEG- DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК: 12:1
LNP19	МС3	МС3/DSPC/холестерин/PEG- DMG 50/10/35/5 липид:миРНК: 8:1
LNP20	МС3	МС3/DSPC/холестерин/PEG- DPG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК: 10:1

LNP21	C12-200	C12- 200/DSPC/холестерин/PEG- DSG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК: 7:1
LNP22	ХТС	ХТС/DSPC/холестерин/PEG- DSG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК: 10:1

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин

DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин

PEG-DMG: PEG-дидимиристоилглицерин (C14-PEG или PEG-C14)
(PEG со ср. мол. масс. 2000)

PEG-DSG: PEG-дистирилглицерин (C18-PEG или PEG-C18) (PEG со ср. мол. масс. 2000)

PEG-cDMA: PEG-карбамоил-1,2-димиристиллоксипропиламин (PEG со ср. мол. масс. 2000)

SNALP (1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)) содержит составы, описанные в международной публикации № WO2009/127060, поданной 15 апреля 2009 года, которая, таким образом, включена посредством ссылки.

ХТС содержит составы, которые описаны, например, в предварительной заявке США с серийным № 61/148,366, поданной 29 января 2009 года; предварительной заявке США с серийным № 61/156,851, поданной 2 марта 2009 года; предварительной заявке США с серийным №, поданной 10 июня 2009 года; предварительной заявке США с серийным № 61/228,373, поданной 24 июля 2009 года; предварительной заявке США с серийным № 61/239,686, поданной 3 сентября 2009 года, и международной заявке № PCT/US2010/022614, поданной 29 января 2010 года, которые, таким образом, включены посредством ссылки.

МС3 содержит составы, которые описаны, например, в публикации США № 2010/0324120, поданной 10 июня 2010 года, все содержание которой, таким образом, включено посредством ссылки.

ALNY-100 содержит составы, описанные, например, в международной патентной заявке № PCT/US09/63933, поданной 10 ноября 2009 года, которая, таким образом, включена посредством

ССЫЛКИ.

C12-200 содержит составы, которые описаны в предварительной заявке США с серийным № 61/175,770, поданной 5 мая 2009 года, и международной заявке № PCT/US10/33777, поданной 5 мая 2010 года, которые, таким образом, включены посредством ссылки.

Синтез ионизируемых/катионных липидов

Любые соединения, например, катионные липиды и т. п., используемые в частицах нуклеиновая кислота-липид по изобретению, можно получать с использованием известных способов органического синтеза, включая способы, описанные более подробно в примерах. Все заместители представляют собой то, что определено далее, если не указано иное.

«Алкил» обозначает неразветвленную цепь или разветвленный, нециклический или циклический, насыщенный алифатический углеводород, содержащий от 1 до 24 атомов углерода. Репрезентативные насыщенные алкилы с неразветвленной цепью включают метил, этил, н-пропил, н-бутил, н-пентил, н-гексил и т. п.; тогда как насыщенные разветвленные алкилы включают изопропил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, изопентил и т. п. Репрезентативные насыщенные циклические алкилы включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и т. п.; тогда как ненасыщенные циклические алкилы включают циклопентенил и циклогексенил, и т. п.

«Алкенил» обозначает алкил, как определено выше, содержащий по меньшей мере одну двойную связь между смежными атомами углерода. Алкенилы включают как цис-, так и транс-изомеры. Репрезентативные алкенилы с неразветвленной и разветвленной цепью включают этиленил, пропиленил, 1-бутенил, 2-бутенил, изобутиленил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-метил-1-бутенил, 2-метил-2-бутенил, 2,3-диметил-2-бутенил и т. п.

«Алкинил» обозначает какой-либо алкил или алкенил, как определено выше, который дополнительно содержит по меньшей мере одну тройную связь между смежными углеродами. Репрезентативные алкинилы с неразветвленной и разветвленной цепью включают ацетиленил, пропинил, 1-бутинил, 2-бутинил, 1-пентинил, 2-пентинил, 3-метил-1-бутинил и т. п.

«Ацил» обозначает какой-либо алкил, алкенил или алкинил, в котором углерод в точке прикрепления замещен оксогруппой, как определено далее. Например, $-C(=O)$ алкил, $-C(=O)$ алкенил и $-C(=O)$ алкинил представляют собой ацильные группы.

«Гетероцикл» обозначает 5-7-членное моноциклическое или 7-10-членное бициклическое, гетероциклическое кольцо, которое является насыщенным, ненасыщенным или ароматическим и которое содержит 1 или 2 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и в которых гетероатомы азота и серы необязательно могут быть окислены, и гетероатом азота необязательно может быть кватернизированным, включая бициклические кольца, в которых любой из приведенных выше гетероциклов конденсирован с кольцом бензола. Гетероцикл можно прикреплять через какой-либо гетероатом или атом углерода. Гетероциклы включают гетероарилы, как определено далее. Гетероциклы включают морфолинил, пирролидинонил, пирролидинил, пиперидинил, пиперизинил, гидантоинил, валеролактамил, оксиранил, оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, тетрагидропиридинил, тетрагидропиримидинил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил, тетрагидропиримидинил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил и т. п.

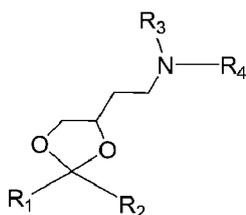
Термины «необязательно замещенный алкил», «необязательно замещенный алкенил», «необязательно замещенный алкинил», «необязательно замещенный ацил» и «необязательно замещенный гетероцикл» обозначает, что при замещении по меньшей мере один атом водорода заменяют заместителем. В случае заместителя оксо ($=O$) заменяют два атома водорода. В связи с этим, заместители включают оксо, галоген, гетероцикл, $-CN$, $-OR_x$, NR_xR_y , $NR_xC(=O)R_y$, $NR_xSO_2R_y$, $C(=O)R_x$, $C(=O)OR_x$, $C(=O)NR_xR_y$, $-SOnR_x$ и $SOnNR_xR_y$, в которых n равно 0, 1 или 2, R_x и R_y представляют собой одно и то же или различающееся и независимо водород, алкил или гетероцикл, и каждый из указанных заместителей алкила и гетероцикла может быть дополнительно замещен одним или несколькими из оксо, галогена, $-OH$, $-CN$, алкила, $-OR_x$, гетероцикла, NR_xR_y , $NR_xC(=O)R_y$, $NR_xSO_2R_y$, $C(=O)R_x$, $C(=O)OR_x$, $C(=O)NR_xR_y$, $SOnR_x$ и $SOnNR_xR_y$.

«Галоген» обозначает фтор, хлор, бром и йод.

В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению могут требовать использования защитных групп. Технология защитных групп хорошо известна специалистам в данной области (см., например, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Green, T.W. et al., Wiley-Interscience, New York City, 1999). В кратком изложении, защитные группы в рамках контекста данного изобретения представляют собой какую-либо группу, которая уменьшает или устраняет нежелательную реакционную способность функциональной группы. Защитную группу можно добавлять к функциональной группе, чтобы маскировать ее реакционную способность во время определенных реакций и затем удалять для того, чтобы раскрыть исходную функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления используют «защитную группу спирта». «Защитная группа спирта» представляет собой какую-либо группу, которая снижает или устраняет нежелательную реакционную способность спиртовой функциональной группы. Защитные группы можно добавлять или удалять с использованием способов, хорошо известных в данной области.

Синтез формулы А

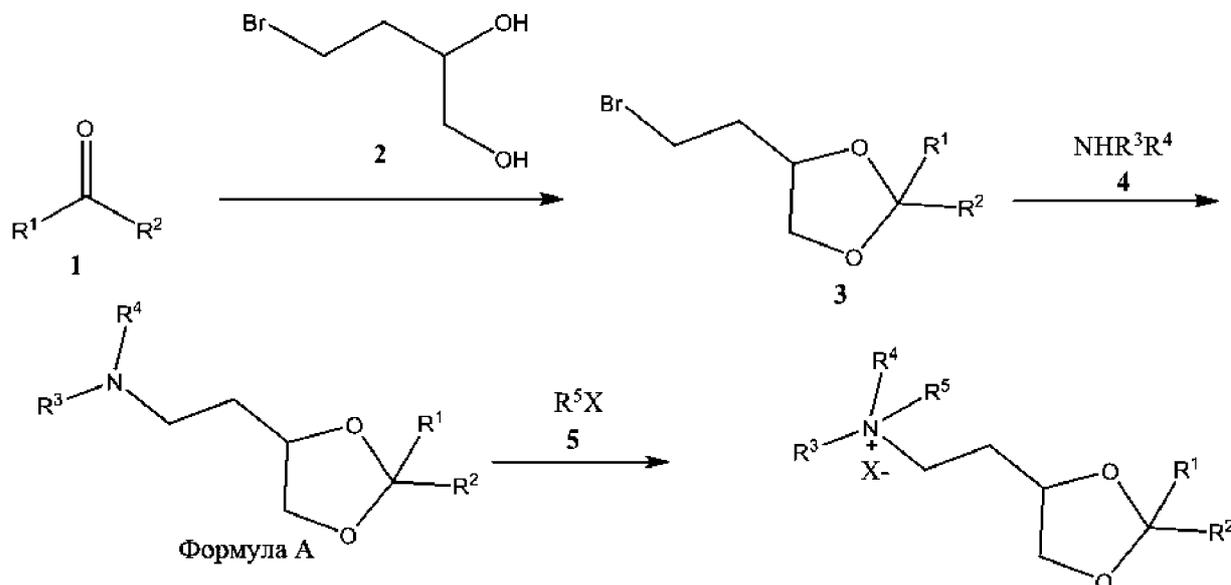
В некоторых вариантах осуществления частицы нуклеиновая кислота-липид по изобретению формулируют с использованием катионного липида формулы А:



где R1 и R2 независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, каждый может быть необязательно замещенным, и R3 и R4 независимо представляют собой низший алкил или R3 и R4 можно брать вместе для того, чтобы формировать необязательно замещенное гетероциклическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой ХТС (2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан). В целом, липид приведенной выше формулы А можно получать с помощью следующих

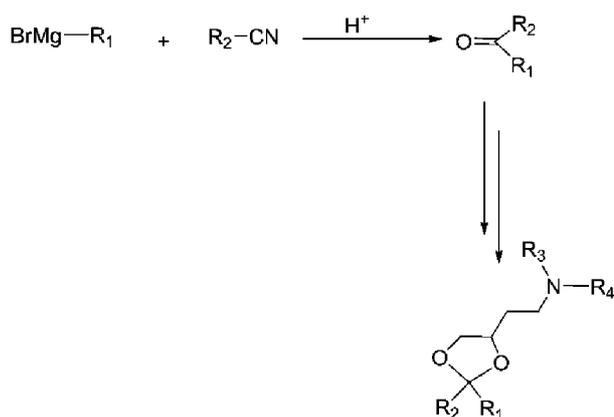
схем реакции 1 или 2, в которых все заместители представляют собой то, что определено выше, если не указано иное.

Схема 1



Липид А, где R1 и R2 независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, каждый необязательно может быть замещен, и R3 и R4 независимо представляют собой низший алкил или R3 и R4 можно брать вместе для того, чтобы формировать необязательно замещенное гетероциклическое кольцо, можно получать в соответствии со схемой 1. Кетон 1 и бромид 2 можно приобретать или получать в соответствии со способами, известными специалистам в данной области. Реакция 1 и 2 дает кеталь 3. Обработка кетала 3 амином 4 дает липиды формулы А. Липиды формулы А можно превращать в соответствующую соль аммония с использованием органической соли формулы 5, где X представляет собой анионный противоион, выбранный из галогена, гидроксида, фосфата, сульфата или тому подобного.

Схема 2



Альтернативно, исходный материал кетона 1 можно получать в соответствии со схемой 2. Реактив Гриньяра 6 и цианид 7 можно приобретать или получать в соответствии со способами, известными специалистам в данной области. Реакция 6 и 7 дает кетон 1. Кетон 1 в соответствующие липиды формулы А превращают, как описано в схеме 1.

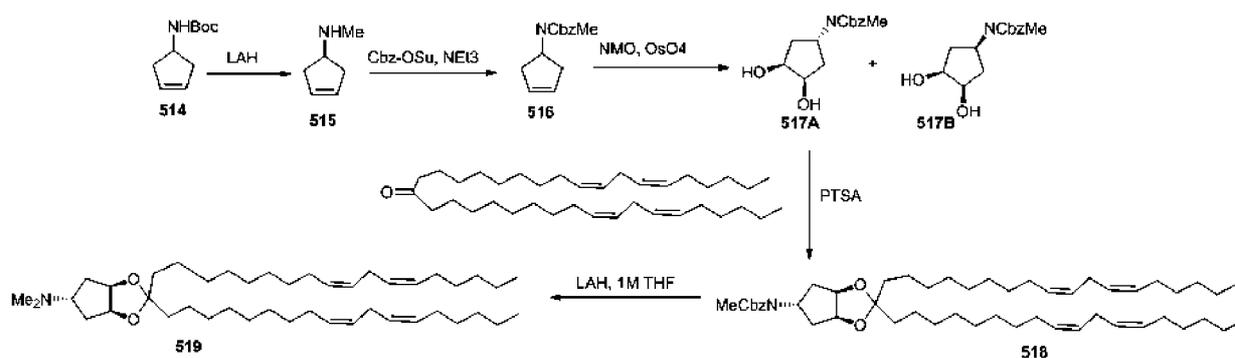
Синтез МСЗ

Получение DLin-M-C3-DMA (т. е., (6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-гептатриаконта-6, 9, 28, 31-тетраен-19-ил 4-(диметиламино)бутаноата) происходило следующим образом. Раствор (6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-гептатриаконта-6, 9, 28, 31-тетраен-19-ола (0,53 г), гидрохлорида 4-N,N-диметиламиномасляной кислоты (0,51 г), 4-N,N-диметиламинопиридина (0,61 г) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорида (0,53 г) в дихлорметане (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Раствор промывали разбавленной соляной кислотой, после чего следовал разбавленный водный бикарбонат натрия. Органические фракции сушили над безводным сульфатом магния, фильтровали и растворитель удаляли на роторном испарителе. Остаток пропускали через колонку с силикагелем (20 г), используя градиент элюирования 1-5% метанол/дихлорметан. Объединяли фракции, содержащие очищенный продукт, и удаляли растворитель, получая бесцветное масло (0,54 г).

Синтез ALNY-100

Синтез кеталя 519 [ALNY-100] осуществляли с использованием следующей схемы 3:

Синтез соединения 515



В перемешанную суспензию LiAlH_4 (3,74 г, 0,09852 моль) в 200 мл безводного THF в круглодонной колбе с двумя горловинами (1 л) медленно добавляли раствор 514 (10 г, 0,04926 моль) в 70 мл THF при 0°C в атмосфере азота. После завершения добавления реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и затем нагревали с обратным холодильником в течение 4 ч. Мониторинг протекания реакции осуществляли посредством TLC. После завершения реакции (по TLC) смесь охлаждали до 0°C и гасили, осторожно добавляя насыщенный раствор Na_2SO_4 . Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре и фильтровали. Остаток тщательно промывали в THF. Фильтрат и смывы смешивали и разбавляли в 400 мл диоксана и 26 мл конц. HCl и перемешивали в течение 20 минут при комнатной температуре. Летучие фракции отгоняли под вакуумом, чтобы получать гидрохлоридную соль соединения 515 в виде твердого вещества белого цвета. Выход: 7,12 г ^1H -ЯМР (DMSO, 400 МГц): $\delta=9,34$ (ушир, 2H), 5,68 (с, 2H), 3,74 (м, 1H), 2,66–2,60 (м, 2H), 2,50–2,45 (м, 5H).

Синтез соединения 516

В перемешанный раствор соединения 515 в 100 мл сухого DCM в 250 мл круглодонной колбе с двумя горловинами добавляли NEt_3 (37,2 мл, 0,2669 моль) и охлаждали до 0°C в атмосфере азота. После медленного добавления N-(бензилокси-карбонил)-сукцинимида (20 г, 0,08007 моль) в 50 мл сухого DCM, реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры. После завершения реакции (2–3 ч по TLC) смесь промывали последовательно в 1 Н растворе HCl (1×100 мл) и насыщенном растворе NaHCO_3 (1×50 мл). Затем органический слой сушили над

безводн. Na_2SO_4 и растворитель испаряли, чтобы получить неочищенный материал, который очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле, чтобы получить соединение 516 в виде липкой массы. Выход: 11 г (89%). ^1H -ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): $\delta=7,36-7,27$ (м, 5H), 5,69 (с, 2H), 5,12 (с, 2H), 4,96 (ушир., 1H) 2,74 (с, 3H), 2,60 (м, 2H), 2,30-2,25 (м, 2H). LC-MS $[\text{M}+\text{H}]^-$ - 232,3 (96,94%).

Синтез соединений 517A и 517B

Циклопентен 516 (5 г, 0,02164 моль) растворяли в растворе из 220 мл ацетона и воды (10:1) в 500 мл круглодонной колбе с одной горловиной и туда добавляли N-метилморфолин-N-оксид (7,6 г, 0,06492 моль), после чего следовало 4,2 мл 7,6% раствора OsO_4 (0,275 г, 0,00108 моль) в трет-бутаноле при комнатной температуре. после завершения реакции (~3 ч), смесь гасили добавлением твердого Na_2SO_3 и получаемую смесь перемешивали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь разводили в DCM (300 мл) и промывали водой (2×100 мл), после чего следовал насыщенный раствор NaHCO_3 (1×50 мл), вода (1×30 мл) и наконец солевой раствор (1×50 мл). Органическую фазу сушили над безводн. Na_2SO_4 и растворитель удаляли в вакууме. Хроматографическая очистка неочищенного материала на колонке с силикагелем давала смесь диастереомеров, которые разделяли посредством препаративной ВЭЖХ. Выход: 6 г неочищенного соединения 517A - пик 1 (твердое вещество белого цвета), 5,13 г (96%). ^1H -ЯМР (DMSO , 400 МГц): $\delta=7,39-7,31$ (м, 5H), 5,04 (с, 2H), 4,78-4,73 (м, 1H), 4,48-4,47 (d, 2H), 3,94-3,93 (м, 2H), 2,71 (с, 3H), 1,72- 1,67 (м, 4H). LC-MS - $[\text{M}+\text{H}]^-$ -266,3, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ -283,5 присутствует, ВЭЖХ-97,86%. Стереохимию подтверждали с помощью рентгена.

Синтез соединения 518

Используя процедуру, аналогичную той, что описана для синтеза соединения 505, соединение 518 (1,2 г, 41%) получали в виде бесцветного масла. ^1H -ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): $\delta=7,35-7,33$ (м, 4H), 7,30-7,27 (м, 1H), 5,37-5,27 (м, 8H), 5,12 (с, 2H), 4,75 (м, 1H), 4,58-4,57 (м, 2H), 2,78-2,74 (м, 7H), 2,06-2,00 (м,

8H), 1,96-1,91 (м, 2H), 1,62 (м, 4H), 1,48 (м, 2H), 1,37-1,25 (ушир. м, 36H), 0,87 (м, 6H). ВЭЖХ-98,65%.

Основная процедура для синтеза соединения 519

Раствор соединения 518 (1 экв.) в гексане (15 мл) добавляли по каплям в ледяной раствор ЛАН в THF (1 M, 2 экв.). После завершения добавления смесь нагревали при 40°C в течение 0,5 ч, затем снова охлаждали на ледяной бане. Смесь аккуратно гидролизовали насыщенным водным Na₂SO₄, затем фильтровали через целит и восстанавливали до масла. Колоночная хроматография предоставляла чистое соединение 519 (1,3 г, 68%), которое получали в виде бесцветного масла. ¹³C ЯМР δ=130,2, 130,1 (×2), 127,9 (×3), 112,3, 79,3, 64,4, 44,7, 38,3, 35,4, 31,5, 29,9 (×2), 29,7, 29,6 (×2), 29,5 (×3), 29,3 (×2), 27,2 (×3), 25,6, 24,5, 23,3, 226, 14,1; MS с электрораспылением (+ve): молекулярная масса C₄₄H₈₀NO₂ (M+H)⁺ вычисленн. 654,6, наблюдаем. 654,6.

Составы, полученные с помощью или стандартного способа или способа без экструзии, можно охарактеризовать схожим образом. Например, характеристики составов типично определяют посредством визуального осмотра. Они будут представлять собой белесые полупрозрачные растворы, не содержащие агрегатов или осадка. Размер частицы и распределение размеров частиц у липидных наночастиц можно измерять посредством рассеяния света, используя, например, Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, USA). Частицы должны иметь размер приблизительно 20-300 нм, например, 40-100 нм. Распределение размеров частиц должно быть одномодальным. Концентрация общей дцРНК в составе, а также захваченную фракцию оценивают с использованием анализа с исключением красителя. Образец состава дцРНК можно инкубировать с РНК-связывающим красителем, таким как Ribogreen (Molecular Probes) в присутствии или отсутствии поверхностно-активного средства, разрушающего состав, например, 0,5% Triton-X100. Общую дцРНК в составе можно определять с помощью сигнала от образца, содержащего поверхностно-активное средство, относительно калибровочной кривой. Захваченную фракцию определяют посредством вычитания содержаний «свободной» дцРНК (как измеряют по сигналу

в отсутствие поверхностно-активного средства) из содержания общей дцРНК. Процент захваченной дцРНК типично составляет >85%. Для состава SNALP размер частицы составляет по меньшей мере 30 нм, по меньшей мере 40 нм, по меньшей мере 50 нм, по меньшей мере 60 нм, по меньшей мере 70 нм, по меньшей мере 80 нм, по меньшей мере 90 нм, по меньшей мере 100 нм, по меньшей мере 110 нм и по меньшей мере 120 нм. Подходящий диапазон типично составляет приблизительно от по меньшей мере 50 нм приблизительно до по меньшей мере 110 нм, приблизительно от по меньшей мере 60 нм приблизительно до по меньшей мере 100 нм или приблизительно от по меньшей мере 80 нм приблизительно до по меньшей мере 90 нм.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в водных или неводных средах, капсулы, гелевые капсулы, саше, таблетки или минитаблетки. Могут быть желательны загустители, ароматизаторы, разбавители, эмульсификаторы, диспергирующие средства или связывающие средства. В некоторых вариантах осуществления оральные составы представляют собой те, в которых дцРНК по изобретению вводят в сочетании с одним или несколькими усиливающими проникновение поверхностно-активными средствами и хелаторами. Подходящие поверхностно-активные средства включают жирные кислоты и/или сложные эфиры или их соли, желчные кислоты и/или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли включают хенодезоксихолевую кислоту (CDCA) и урсодезоксиенодезоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюхолевую кислоту, глихолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, тауродезоксихолевую кислоту, тауро-24,25-дигидро-фузидат натрия и гликодигидрофузидат натрия. Подходящие жирные кислоты включают арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил 1-монокапрат, 1-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитин,

ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую). В некоторых вариантах осуществления используют комбинации усилителей проникновения, например, жирные кислоты/соли в комбинации с желчными кислотами/солями. Одна образцовая комбинация представляет собой комбинацию натревлц соли лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA. Дополнительные усилители проникновения включают простой полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, простой полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир. дцРНК по изобретению можно доставлять перорально, в гранулярной форме, включая частицы, высушенные распылением, или в комплексе для того, чтобы формировать микро или наночастицы. дцРНК-комплексообразующие средства включают полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксетаны, полиалкилцианоакрилаты; катионированные желатины, альбумины, крахмалы, акрилаты, полиэтиленгликоли (PEG) и крахмалы; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-производные полиимины, поллуланы, целлюлозы и крахмалы. Подходящие комплексообразующие средства включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламинометилэтилен Р (TDAE), полиаминостирол (например, п-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D, L-молочную кислоту), поли(DL-молочную-ко-гликолевую кислоту) (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG). Оральные составы для дцРНК и их получение описаны подробно в патенте США 6887906, публикации США № 20030027780 и патенте США № 6747014, каждое включено в настоящий документ посредством ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интрапаренхимального (в головной мозг), интратекального, внутрижелудочкового или внутripеченочного введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки, такие как, но не ограничиваясь этим, усилители проникновения,

соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают, но не ограничиваясь этим, растворы, эмульсии и липосомлсодержащие составы. Эти композиции можно получать из различных компонентов, которые включают, но не ограничиваясь этим, предварительно сформированные жидкости, самоэмульсифицирующиеся твердые вещества и самоэмульсифицирующиеся полутвердые вещества. Особенно предпочтительными являются составы, которые направлены на печень, когда лечат нарушения печени, такие как печеночная карцинома.

Фармацевтические составы по настоящему изобретению, которые можно удобно представлять в стандартной дозированной форме, можно получать в соответствии с общепринятыми способами, хорошо известными в фармацевтической промышленности. Такие способы включают стадию ассоциации активных ингредиентов с фармацевтическим носителем (носителями) или эксципиентом (эксципиентами). В целом, составы получают посредством единообразной и тщательной ассоциации активных ингредиентов с жидкими носителями или тонкодисперсными твердыми носителями или и с теми и с другими и затем, в случае необходимости, придавая продукту геометрическую форму.

Композиции по настоящему изобретению можно формулировать в какой-либо из многих возможных дозированных форм, таких как, но не ограничиваясь этим, таблетки, капсулы, гелевые капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели, суппозитории и клизмы. Композиции по настоящему изобретению также можно формулировать в виде суспензий в водных, неводных или смешанных средах. Водные суспензии дополнительно могут содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, в том числе, например, карбоксиметилцеллюлоза натрия, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

C. Дополнительные составы

i. Эмульсии

Композиции по настоящему изобретению можно получать и

формулировать в виде эмульсий. Эмульсии типично представляют собой гетерогенные системы из одной жидкости, диспергированной в другой в форме капелек, обычно превышающих 0,1 мкм в диаметре (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8-е издание), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, под редакцией Lieberman, Rieger и Banker, 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 199; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, под редакцией Lieberman, Rieger и Banker, 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 245; Block в Pharmaceutical Dosage Forms, под редакцией Lieberman, Rieger и Banker, 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 2, стр. 335; Higuchi et al., в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, стр. 301). Эмульсии часто представляют собой двухфазные системы, которые содержат две несмешиваемых жидких фазы, тщательно перемешанных и диспергированных друг в друге. В целом, эмульсии могут быть вида вода-в-масле (в./м.) или масло-в-воде (м./в.). Когда водная фаза тщательно раздроблена и диспергирована в виде мелких капелек в объемной масляной фазе, получаемую композицию называют эмульсией вода-в-масле (в./м.). Альтернативно, когда масляная фаза тщательно раздроблена и диспергирована в виде мелких капелек в объемной водной фазе, получаемую композицию называют эмульсией масло-в-воде (м./в.). В дополнение к диспергированным фазам эмульсии могут содержать дополнительные компоненты и активное лекарственное средство, которое может присутствовать в виде раствора в водной фазе, масляной фазе или само по себе в виде отдельной фазы. При необходимости, фармацевтические эксципиенты, такие как эмульсификаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты, также могут присутствовать в эмульсиях. Фармацевтические эмульсии также могут представлять собой множественные эмульсии, которые состоят из больше чем двух фаз, такие как, например, в случае эмульсий масло-в-воде-в-масле (м./в./м.) и вода-в-масле-в-воде (в./м./в.). Такие комплексные составы часто обеспечивают

определенные преимущества, которые простые бинарные эмульсии не обеспечивают. Множество эмульсий, в которых отдельные капельки масла м./в. эмульсии окружают маленькие капельки воды, образуют в./м./в. эмульсию. Аналогичным образом, система масляных капелек, окруженных глобулами из воды, стабилизированной в непрерывной масляной фазе, предоставляет м./в./м. эмульсию.

Эмульсии отличаются небольшой или нулевой термодинамической стабильностью. Часто, диспергированная или прерывающаяся фаза эмульсии хорошо диспергирована во внешней или непрерывной фазе и сохраняется в этой форме с помощью эмульсификаторов или вязкости состава. Любая из фаз эмульсии может быть полутвердой или твердой, как в случае основ для мазей по типу эмульсии и кремов. Другие средства стабилизации эмульсий влекут использование эмульсификаторов, которые могут встраиваться в любую фазу эмульсии. Эмульсификаторы грубо можно разделить на четыре категории: синтетические поверхностно-активные средства, встречающиеся в природе эмульсификаторы, абсорбирующие основы и тонкодисперсные твердые вещества (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8-е издание), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, под редакцией Lieberman, Rieger и Banker, 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 199).

Обнаружено, что синтетические поверхностно-активные средства, также известные как поверхностно-активные средства, имеют широкое применение в составе эмульсий и рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8-е издание), New York, NY; Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, под редакцией Lieberman, Rieger и Banker, 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 285; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, под редакцией Lieberman, Rieger и Banker, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, том 1, стр. 199). Поверхностно-активные средства типично являются амфифильными и содержат гидрофильную и

гидрофобную часть. Соотношение гидрофильных и гидрофобных свойств поверхностно-активного средства называют гидрофильный/липофильный баланс (HLB), и оно является полезным инструментом для классификации и выбора поверхностно-активных средств при получении составов. Поверхностно-активные средства можно разделить на различные классы на основании свойств гидрофильной группы: неионная, анионная, катионная и амфотерная (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8-е издание), New York, NY, Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, под редакцией Lieberman, Rieger и Banker, 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 285).

Встречающиеся в природе эмульсификаторы, используемые в эмульсионных составах, включают ланолин, пчелиный воск, фосфатиды, лецитин и камедь. Абсорбирующие основы обладают гидрофильными свойствами, так что они могут впитывать воду для того, чтобы формировать в./м. эмульсии, при этом сохраняя свою полутвердую консистенцию, например, безводный ланолин и гидрофильный вазелин. Тонкодисперсные твердые вещества также используют в качестве хороших эмульсификаторов, в частности, в комбинации с поверхностно-активными средствами и в вязких препаратах. Они включают поляные неорганические твердые вещества, такие как гидроксиды тяжелых металлов, ненабухающие глины, такие как бентонит, аттапульгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный силикат алюминия и коллоидный силикат магния алюминия, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как углерод или глицерилтристеарат.

В эмульсионные составы также включено большое разнообразие неэмульгирующих материалов, которые вносят вклад в свойства эмульсий. Они включают жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, сложные жирные эфиры, увлажнители, гидрофильные коллоиды, консерванты и антиоксиданты (Block, в Pharmaceutical Dosage Forms, под редакцией Lieberman, Rieger и Banker, 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 335; Idson, в

Pharmaceutical Dosage Forms, под редакцией Lieberman, Rieger и Banker, 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 199).

Гидрофильные коллоиды или гидроколлоиды включают встречающиеся в природе камеди и синтетические полимеры, такие как полисахариды (например, камедь, агар, альгиновая кислота, каррагенан, гуаровая камедь, камедь карайи и трагакант), производные целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлоза и карбоксипропилцеллюлоза) и синтетические полимеры (например, карбомеры, простые эфиры целлюлозы и карбоксивиниловые полимеры). Они диспергируются или набухают в воде для того, чтобы формировать коллоидные растворы, которые стабилизируют эмульсии посредством формирования прочных пленок на поверхности раздела вокруг капелек диспергированной фазы и посредством увеличения вязкости внешней фазы.

Поскольку эмульсии часто содержат множество ингредиентов, таких как углеводы, белки, стеринны и фосфатиды, которые могут легко поддерживать рост микробов, эти составы часто содержат консерванты. Широко используемые консерванты, содержащиеся в эмульсионных составах, включают метилпарабен, пропилпарабен, четвертичные аммониевые соли, хлорид бензалкония, сложные эфиры *p*-гидроксибензойной кислоты и борной кислоты. Антиоксиданты также обыкновенно добавляют в эмульсионные составы для того, чтобы предотвращать ухудшение состава. Используемые антиоксиданты могут представлять собой поглотители свободных радикалов, такие как токоферолы, алкилгаллаты, бутилированный гидроксанизол, бутилированный гидрокситолуол или восстанавливающие средства, такие как аскорбиновая кислота и метабисульфит натрия, и синергисты антиоксидантов, такие как лимонная кислота, винная кислота и лецитин.

Применение эмульсионных составов через дерматологические, оральные и парентеральные пути, а также способы их получения рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8-e

издание), New York, NY; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, под редакцией Lieberman, Rieger и Banker, 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 199). Эмульсионные составы для оральной доставки получили широкое использование по причине простоты состава, а также эффекта с точки зрения абсорбции и биодоступности (см., например, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8-е издание), New York, NY; Rosoff, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, под редакцией Lieberman, Rieger и Banker, 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 245; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, под редакцией Lieberman, Rieger и Banker, 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 199). Слабительные средства на основе минерального масла, жирорастворимые витамины и высокожирные пищевые препараты относятся к материалам, которые обыкновенно вводят перорально в виде м./в. эмульсий.

ii. Микроэмульсии

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, композиции иРНК и нуклеиновые кислоты формулируют в виде микроэмульсий. Микроэмульсию можно определять как систему из воды, масла и амфифильного соединения, которая является единым оптически изотропным и термодинамически стабильным жидким раствором (см., например, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8-е издание), New York, NY; Rosoff, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, под редакцией Lieberman, Rieger и Banker, 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 245). Типично микроэмульсии представляют собой системы, которые получают посредством сначала диспергирования масла в водном растворе поверхностно-активного средства и затем добавления достаточного количества четвертого компонента, обычно спирта с цепью средней длины, чтобы формировать прозрачную систему. Следовательно, микроэмульсии также описывают как термодинамически стабильные, изотропно прозрачные дисперсии из двух несмешиваемых жидкостей, которые стабилизируют с помощью

пленок из поверхностных-активных молекул на поверхности раздела (Leung and Shah, в: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, ред. Rosoff, M., 1989, VCH Publishers, New York, страницы 185-215). Микроэмульсии обыкновенно получают через объединение от трех до пяти компонентов, которые включают масло, воду, поверхностно-активное средство, вторичное поверхностно-активное средство и электролит. Является ли микроэмульсия водой-в-масле (в./м.) или маслом-в-воде (м./в.), зависит от свойств используемого масла и поверхностно-активного средства и от структуры и геометрической упаковки полярных головок и углеводородных хвостов молекул поверхностно-активного средства (Schott, в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, стр. 271).

Экстенсивно исследован феноменологический подход с использованием фазовых диаграмм, который дает специалисту в данной области всесторонние знания о том, как формулировать микроэмульсии (см., например, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8-е издание), New York, NY; Rosoff, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, под редакцией Lieberman, Rieger и Banker, 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 245; Block, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, под редакцией Lieberman, Rieger и Banker, 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 335). По сравнению со стандартными эмульсиями, микроэмульсии дают преимущество солюбилизации водонерастворимых лекарственных средств в составе термодинамически стабильных капель, которые образуются самопроизвольно.

Поверхностно-активные средства, используемые при получении микроэмульсий, включают, но не ограничиваясь этим, ионные поверхностно-активные средства, неионные поверхностно-активные средства, Brij 96, простые полиоксиэтиленолеиловые эфиры, сложные полиглицериновые эфиры жирных кислот, тетраглицеринмонолаурат (ML310), тетраглицеринмоноолеат (MO310), гексаглицеринмоноолеат (PO310), гексаглицеринпентаолеат (PO500),

декаглицеринмонокапрат (MCA750), декаглицеринмоноолеат (MO750), декаглицеринсесквиолеат (SO750), декаглицериндекаолеат (DAO750), отдельно или в комбинации с вторичными поверхностно-активными средствами. Вторичное поверхностно-активное средство, обычно спирт с короткой цепью, такой как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит для увеличения текучести на поверхности раздела посредством проникновения в пленку поверхностно-активного средства и, следовательно, создания нарушенной пленки благодаря пустому пространству, образуемому между молекулами поверхностно-активного средства. Однако микроэмульсии можно получать без использования вторичных поверхностно-активных средств и в данной области известны самоэмульгирующиеся микроэмульсионные системы без спиртов. Водная фаза типично, но не ограничиваясь этим, может представлять собой воду, водный раствор лекарственного средства, глицерин, PEG300, PEG400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляная фаза может включать, но не ограничиваясь этим, такие материалы, как Captex 300, Captex 355, Carmul MCM, сложные эфиры жирных кислот, моно-, ди- и триглицериды со средней цепью (C₈-C₁₂), сложные эфиры полиоксиэтилированных глицеролов и жирных кислот, жирные спирты, полиглицеролизированные глицериды, насыщенные полиглицеролизированные C₈-C₁₀ глицериды, растительные масла и силиконовое масло.

Микроэмульсии, в частности, представляют интерес с точки зрения солюбилизации лекарственного средства и увеличенной абсорбции лекарственных средств. Микроэмульсии на основе липидов (как м./в., так и в./м.) предложены для увеличения оральной биодоступности лекарственных средств, в том числе пептидов (см., например, патенты США № 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). Микроэмульсии дают преимущества усовершенствованной солюбилизации лекарственного средства, защиты лекарственного средства от ферментативного гидролиза, возможного усиления абсорбции лекарственного средства из-за индуцируемых поверхностно-активными средствами изменений в текучести и

проницаемости мембран, легкости получения, легкости перорального введения через твердые дозированные формы, улучшенной клинической активности и сниженной токсичности (см., например, патенты США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). Часто микроэмульсии могут образовываться самопроизвольно, когда их компоненты собираются вместе при температуре окружающей среды. Это может быть особенно благоприятно при формулировании термолабильных лекарственных средств, пептидов или иРНК. Микроэмульсии также эффективны при трансдермальной доставке активных компонентов как в косметических, так и в фармацевтических применениях. Ожидают, что микроэмульсионные композиции и составы по настоящему изобретению будут содействовать увеличенной системной абсорбции иРНК и нуклеиновых кислот из желудочно-кишечного тракта, а также усовершенствовать локальное накопление иРНК и нуклеиновых кислот в клетках.

Микроэмульсии по настоящему изобретению также могут содержать дополнительные компоненты и добавки, такие как сорбитанмоностеарат (Grill 3), Labrasol и усилители проникновения, для усовершенствования свойств состава и усиления абсорбции иРНК и нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Усилители проникновения, используемые в микроэмульсиях по настоящему изобретению, можно классифицировать как относящиеся к одной из пяти широких категорий - поверхностно-активные средства, жирные кислоты, желчные соли, хелатирующие средства и нехелатирующие поверхностно-неактивные средства (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, стр. 92). Каждый из этих классов рассмотрен выше.

iii. Микрочастицы

иРНК средство по изобретению можно встраивать в частицы, например, микрочастицы. Микрочастицы можно получать посредством распылительной сушки, но также можно получать другими способами, включая лиофилизацию, испарение, сушку в псевдооживленном слое, вакуумную сушку или комбинацию этих способов.

iv. Усилители проникновения

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения используют различные усилители проникновения для осуществления эффективной доставки нуклеиновых кислот, в частности иРНК, в кожу животных. Большинство лекарственных средств присутствуют в растворе как в ионизированной, так и в не ионизированной формах. Однако обычно только растворимые в липидах или липофильных лекарственных средства легко проходят через клеточные мембраны. Обнаружено, что даже не липофильные лекарственные средства могут проходить через клеточные мембраны, если мембрану, через которую нужно пройти, обрабатывают усилителем проникновения. В дополнение к содействию диффузии не липофильных лекарственных средств через клеточные мембраны, усилители проникновения также увеличивают проницаемость липофильных лекарственных средств.

Усилители проникновения можно классифицировать как относящиеся к одной из пяти обширных категорий, т. е., поверхностно-активные средства, жирные кислоты, желчные соли, хелатирующие средства и нехелатирующие поверхностно-неактивные средства (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, стр. 92). Каждый из указанных выше классов усилителей проникновения описан далее более подробно.

Поверхностно-активные средства (или «сурфактанты») представляют собой химические частицы, которые при растворении в водном растворе, снижают поверхностное натяжение раствора или межфазное натяжение между водным раствором и другой жидкостью, в результате чего происходит усиление абсорбции иРНК через слизистые. В дополнение к желчным солям и жирным кислотам, эти усилители проникновения включают, например, лаурилсульфат натрия, простой полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир и простой полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир) (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, стр. 92); и эмульсии перфторсоединений, таких как FC-43. Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

Различные жирные кислоты и их производные, которые действуют в качестве усилителей проникновения, включают, например, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприновую кислоту (н-декановую кислоту), миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеил-рац-глицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, глицерин 1-монокапрат, 1-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, их сложные C₁₋₂₀ алкиловые эфиры (например, метил, изопропил и т-бутил) и их моно- и диглицериды (т. е., олеат, лаурат, капрат, миристанат, пальмитат, стеарат, линолеат и т. д.) (см., например, Touitou, E., et al. *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, стр. 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

Физиологическая роль желчи включает облегчение диспергирования и абсорбции липидов и жирорастворимых витаминов (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, глава 38 в: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9-е изд., под редакцией Hardman et al., McGraw-Hill, New York, 1996, стр. 934-935). Различные природные желчные соли и их синтетические производные действуют в качестве усилителей проникновения. Таким образом термин «желчные соли» включает какие-либо встречающиеся в природе компоненты желчи, а также какие-либо их синтетические производные. Подходящие желчные соли включают, например, холевую кислоту (или ее фармацевтически приемлемую натриевую соль, холат натрия), дегидрохолевую кислоту (дегидрохолат натрия), дезоксихолевую кислоту (дезоксихолат натрия), глюхолевую кислоту (глюхолат натрия), глихолевую кислоту (гликохолат натрия), гликодезоксихолевую кислоту (гликодезоксихолат натрия), таурохолевую кислоту (таурохолат натрия), тауродезоксихолевую кислоту (тауродезоксихолат натрия), хенодезоксихолевую кислоту

(хенодезоксихолат натрия), урсодезоксихолевую кислоту (UDCA), тауро-24,25-дигидрофузидат натрия (STDHF), гликодигидрофузидат натрия и простой полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир (ПОЕ) (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, стр. 92; Swinyard, глава 39 в: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18-е издание, под редакцией Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, стр. 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita et al., *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583).

Хелатирующие средства, как используют в связи с настоящим изобретением, можно определять как соединения, которые удаляют металлические ионы из раствора посредством образования комплексов и при этом ведут к усилению абсорбции иРНК через слизистую. В отношении их использования в качестве усилителей проникновения в настоящем изобретении, хелатирующие средства имеют такое дополнительное преимущество, что также выполняют роль ингибиторов ДНКазы, поскольку большинство охарактеризованных ДНК нуклеаз требуют двухвалентных ионов металлов для катализа и, таким образом, подвергаются ингибированию хелатирующими средствами (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993618315-339). Подходящие хелатирующие средства включают, но не ограничиваясь этим этилендиаминтетраацетат динатрия (EDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат натрия, 5-метоксисалицилат и гомованилат), N-ацильные производные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацильные производные бета-дикетонов (енаминов) (см., например, Katdare, A. et al., *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, стр. 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

Как используют в настоящем документе, нехелатирующие

поверхностно-неактивные усиливающие проникновение соединения можно определять как соединения, которые проявляют незначительную активность в качестве хелатирующих средств или в качестве поверхностно-активных, но которые тем не менее усиливают абсорбцию иРНК через слизистую пищеварительной системы (см., например, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Этот класс усилителей проникновения включает, например, ненасыщенные циклические мочевины, производные 1-алкил- и 1-алкенилазациклоалканонов (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, стр. 92); и нестероидные противовоспалительные средства, такие как диклофенак натрия, индометацин и фенилбутазон (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

Средства, которые увеличивают накопление иРНК на клеточном уровне, также можно добавлять в фармацевтические и другие композиции по настоящему изобретению. Например, катионные липиды, такие как липофектин (Junichi et al, патент США № 5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (Lollo et al., заявка РСТ WO 97/30731), также известны в качестве усилителей накопления дцРНК в клетках. Примеры коммерчески доступных реактивов для трансфекции включают, например, Липофектамин™ (Invitrogen™; Carlsbad, CA), Липофектамин 2000™ (Invitrogen™; Carlsbad, CA), 293fectin™ (Invitrogen™; Carlsbad, CA), Селлфектин™ (Invitrogen™; Carlsbad, CA), DMR1E-C™ (Invitrogen™; Carlsbad, CA), FreeStyle™ MAX (Invitrogen™; Carlsbad, CA), Липофектамин™ 2000 CD (Invitrogen™; Carlsbad, CA), Липофектамин™ (Invitrogen™; Carlsbad, CA), iRNAMAX (Invitrogen™; Carlsbad, CA), Олигофектамин™ (Invitrogen™; Carlsbad, CA), Optifect™ (Invitrogen™; Carlsbad, CA), реактив для трансфекции X-tremeGENE Q2 (Roche; Grenzacherstrasse, Switzerland), реактив для липосомной трансфекции DOTAP (Grenzacherstrasse, Switzerland), реактив для липосомной трансфекции DOSPER (Grenzacherstrasse, Switzerland) или Eugene (Grenzacherstrasse, Switzerland),

реактив Transfectam® (Promega®; Madison, WI), реактив для трансфекции TransFast™ (Promega®; Madison, WI), реактив Tfx™-20 (Promega®; Madison, WI), реактив Tfx™-50 (Promega®; Madison, WI), DreamFect™ (OZ Biosciences; Marseille, France), EcoTransfect (OZ Biosciences; Marseille, France), реактив для трансфекции TransPass^a D1 (New England Biolabs™; Ipswich, MA, USA), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen™; San Diego, CA, USA), реактив для трансфекции PerFectin (Genlantis™; San Diego, CA, USA), реактив для трансфекции NeuroPORTER® (Genlantis™; San Diego, CA, USA), реактив для трансфекции GenePORTER® (Genlantis™; San Diego, CA, USA), реактив для трансфекции GenePORTER® 2 (Genlantis™; San Diego, CA, USA), реактив для трансфекции Цитофектин (Genlantis™™; San Diego, CA, USA), реактив для трансфекции BaculoPORTER® (Genlantis™; San Diego, CA, USA), реактив для трансфекции TroganPORTER™ (Genlantis™; San Diego, CA, USA), RiboFect (Bioline™; Taunton, MA, USA), PlasFect (Bioline™; Taunton, MA, USA), UniFECTOR (B-Bridge International™; Mountain View, CA, USA), SureFECTOR (B-Bridge International™; Mountain View, CA, USA) или HiFect™ (B-Bridge International™, Mountain View, CA, USA), среди прочих.

Другие средства можно использовать для усиления проникновения введенных нуклеиновых кислот, в том числе гликоли, такие как этиленгликоль и пропиленгликоль, пирролы, такие как 2-пиррол, азоны и терпены, такие как лимонен и ментон.

v. Носители

Определенные композиции по настоящему изобретению в составе также содержат соединения-носители. Как используют в настоящем документе, «соединение-носитель» или «носитель» может относиться к нуклеиновой кислоте или ее аналогу, которые инертны (т. е., не обладают биологической активностью *per se*), но распознаются в качестве нуклеиновой кислоты процессами *in vivo*, которые снижают биодоступность нуклеиновой кислоты, обладающей биологической активностью, например, посредством разрушения биологически

активной нуклеиновой кислоты или содействия ее удалению из циркуляции. Совместное введение нуклеиновой кислоты и соединения-носителя, типично при избытке последнего вещества, может вести к существенному снижению количества нуклеиновой кислоты, извлекаемой в печени, почках или других резервуарах вне циркуляции, предположительно из-за конкуренции между соединением-носителем и нуклеиновой кислотой за общий рецептор. Например, извлечение частично фосфоритовой дцРНК в ткани печени можно снижать, когда ее вводят совместно с полиинозиновой кислотой, сульфатом декстрана, полицитидиновой кислотой или 4-ацетамидо-4'-изотиоцианостильбен-2,2'-дисульфоновой кислотой (Miyao et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183).

vi. Эксципиенты

В отличие от соединения-носителя, «фармацевтический носитель» или «эксципиент» представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующее средство или какой-либо другой фармакологически инертный носитель для доставки одной или нескольких нуклеиновых кислот животному. Эксципиент может представлять собой жидкость или твердое вещество, и его выбирают, учитывая планируемый способ введения, с тем, чтобы обеспечивать желаемый объем, консистенцию и т. д. при объединении с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Типичные фармацевтические носители включают, но не ограничиваясь этим, связывающие средства (например, прежелатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и т. д.); наполнители (например, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин, сульфат кальция, этилцеллюлозу, полиакрилаты или гидрофосфат кальция и т. д.); смазывающие средства (например, стеарат магния, тальк, диоксид кремния, коллоидный диоксид кремния, стеариновую кислоту, металлические стеараты, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоли, бензоат натрия, ацетат натрия и т. д.); разрыхлители (например,

крахмал, крахмалгликолят натрия и т. д.); и увлажняющие средства (например, лаурилсульфат натрия и т. п.).

Фармацевтически приемлемые органические или неорганические эксципиенты, подходящие для не парентерального введения, которые не вступают во вредоносные реакции с нуклеиновыми кислотами, также можно использовать для того, чтобы формулировать композиции по настоящему изобретению. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваясь этим, воду, растворы солей, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т. п.

Составы для топического введения нуклеиновых кислот могут включать стерильные и нестерильные водные растворы, неводные растворы в обыкновенных растворителях, таких как спирты, или растворы нуклеиновых кислот в жидких или твердых масляных основах. Растворы также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Можно использовать фармацевтически приемлемые органические или неорганические эксципиенты, подходящие для не парентерального введения, которые не вступают во вредоносные реакции с нуклеиновыми кислотами.

Подходящие фармацевтически приемлемые эксципиенты включают, но не ограничиваясь этим, воду, растворы солей, спирт, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т. п.

vii. Другие компоненты

Композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, стандартно встречающиеся в фармацевтических композициях, на тех уровнях, при которых их используют в данной области техники. Таким образом, например, композиции могут содержать дополнительные, совместимые, фармацевтически активные материалы, например, такие как противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства, или могут содержать дополнительные материалы, которые можно использовать при физическом формулировании различных дозированных форм композиций

по настоящему изобретению, такие как красители, ароматизаторы, консерванты, антиоксиданты, замутнители, загустители и стабилизаторы. Однако при добавлении такие материалы не должны ненадлежащим образом мешать биологическим активностям компонентов композиций по настоящему изобретению. Составы можно стерилизовать и, при желании, смешивать со вспомогательными средствами, например, смазывающими средствами, консервантами, стабилизаторами, увлажняющими средствами, эмульсификаторами, солями, влияющими на осмотическое давление, буферами, красящими веществами, ароматизаторами и/или ароматическими веществами и т. п., которые не осуществляют вредоносного взаимодействия с нуклеиновой кислотой (нуклеиновыми кислотами) в составе.

Водные суспензии могут содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, в том числе, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по изобретению включают (a) одно или несколько соединений иРНК и (b) одно или несколько средств, которые функционируют посредством не-иРНК механизма и которые можно использовать при лечении гемолитического нарушения. Примеры таких средств включают, но без ограничения, противовоспалительное средство, средство против стеатоза, противовирусное средство и/или средство против фиброза. Кроме того, другие вещества, широко используемые для того, чтобы защищать печень, такие как силимарин, также можно использовать в сочетании с иРНК, описанными в настоящем документе. Другие средства, которые можно использовать для лечения заболеваний печени, включают телбивудин, энтекавир и ингибиторы протеаз, такие как теллапревир и другие, раскрытые, например, в Tung et al., публикациях заявок США №№ 2005/0148548, 2004/0167116 и 2003/0144217; и в Hale et al., публикации заявки США № 2004/0127488.

Токсичность и терапевтический эффект таких соединений можно определять с помощью стандартных фармацевтических процедур в клеточных культурах или у экспериментальных животных, например,

для определения LD50 (дозы, летальной в 50% популяции) и ED50 (дозы, терапевтически эффективной в 50% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс, и его можно выразить в виде соотношения LD50/ED50. Предпочтительны соединения, которые демонстрируют высокие терапевтические индексы.

Данные, полученные в анализах клеточных культур и исследованиях животных можно использовать при формулировании диапазона доз для использования у человека. Дозы композиций по изобретению в настоящем документе лежат в целом в пределах диапазона циркулирующих концентраций, который включает ED50 с небольшой или нулевой токсичностью. Доза может варьировать в этом диапазоне в зависимости от используемой дозированной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, используемого в способах по изобретению, терапевтически эффективную дозу можно оценивать изначально по анализам клеточных культур. Дозу можно формулировать в моделях на животных, чтобы достигать диапазона циркулирующих концентраций соединения в плазме или, когда уместно, полипептидного продукта целевой последовательности (например, достигать сниженной концентрации полипептида), который включает IC50 (т. е., концентрацию тестируемого соединения, которая позволяет достигать полумаксимального ингибирования симптомов), как определяют в клеточной культуре. Такую информацию можно использовать для того, чтобы более точно определять эффективные дозы у человека. Уровни в плазме можно измерять, например, посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение к их введению, как рассмотрено выше, иРНК по изобретению можно вводить в комбинации с другими известными средствами, эффективными при лечении патологических процессов, опосредованных экспрессией AGT. В любом случае, вводящий врач может корректировать количество и время введения иРНК на основании результатов, наблюдаемых с использованием стандартных мер эффекта, известных в данной области или описанных в настоящем документе.

VII. Способы по изобретению

Настоящее изобретение предусматривает терапевтические и профилактические способы, которые включают введение субъекту, имеющему или подверженному развитию AGT-ассоциированного заболевания, нарушения и/или состояния (например, гипертензии), фармацевтических композиций, которые содержат иРНК средство или вектор, содержащий иРНК по изобретению.

В одном из аспектов, настоящее изобретение предусматривает способы лечения субъекта, имеющего нарушение, для которого будет полезно снижение экспрессии AGT, например, AGT-ассоциированное заболевание, например, гипертензию, например, пограничную гипертензию (также известную как прегипертензия), первичную гипертензию (также известный как эссенциальная гипертензия или идеопатическая гипертензия), вторичную гипертензию (также известную как неэссенциальная гипертензия), гипертонический криз (также известный как злокачественная гипертензия), экстренное гипертензивное состояние, изолированную систолическую или диастолическую гипертензию, гипертензию, ассоциированную с беременностью (например, предэклампсию, эклампсию и послеродовую предэклампсию), диабетическую гипертензию, резистентную гипертензию, рефракторную гипертензию, пароксизмальную гипертензию, реноваскулярную гипертензию (также известную как почечная гипертензия), гипертензию Голдблатта, глазную гипертензию, глаукому, легочную гипертензию, портальную гипертензию, системную венозную гипертензию, систолическую гипертензию, лабильную гипертензию; гипертензивную кардиопатию, гипертензивную нефропатию, атеросклероз, артериосклероз, васкулопатию (в том числе заболевание периферических сосудов), диабетическую нефропатию, диабетическую ретинопатию, хроническую сердечную недостаточность, кардиомиопатию, диабетическую кардиомиопатию, гломерулосклероз, коарктацию аорты, аневризму аорты, фиброз желудочков, синдром Кушинга и другие состояния избытка глюкокортикоидов, в том числе хроническая стероидная терапия, феохромоцитома, ренинома, вторичный альдостеронизм, и другие состояния избытка минералокортикоидов, апноэ во сне, заболевание щитовидной/паращитовидной железы, сердечную недостаточность (например, нарушение систолической функции

левого желудочка), инфаркт миокарда, стенокардию, инсульт, сахарный диабет (например, диабетическую нефропатию), заболевание почек, например, хроническую почечную недостаточность или диабетическую нефропатию, необязательно в контексте беременности, почечную недостаточность, например, хроническую почечную недостаточность, нарушение когнитивной функции (такое как болезнь Альцгеймера) и системный склероз (например, склеродермический почечный криз). В определенных вариантах осуществления AGT-ассоциированное заболевание включает задержку внутриутробного развития (IUGR) или задержку развития плода. Способы лечения (и использование) по изобретению включают введение субъекту, например, человеку, терапевтически эффективного количества иРНК средства, направленного на ген AGT, или фармацевтической композиции, которая содержит иРНК средство, направленное на ген AGT, тем самым осуществляя лечение субъекта, имеющего нарушение, для которого будет полезно снижение экспрессии AGT.

В одном из аспектов изобретение относится к способам предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, который имеет нарушение, для которого будет полезно снижение экспрессии AGT, например, AGT-ассоциированное заболевание, например, гипертензию, например, пограничную гипертензию (также известную как прегипертензия), первичную гипертензию (также известную как эссенциальная гипертензия или идеопатическая гипертензия), вторичную гипертензию (также известную как неэссенциальная гипертензия), гипертонический криз (также известный как злокачественная гипертензия), экстренное гипертензивное состояние, изолированную систолическую или диастолическую гипертензию, гипертензию, ассоциированную с беременностью, (например, предэклампсию, эклампсию и послеродовую предэклампсию), диабетическую гипертензию, резистентную гипертензию, рефракторную гипертензию, пароксизмальную гипертензию, реноваскулярную гипертензию (также известную как почечная гипертензия), гипертензию Голдблатта, глазную гипертензию, глаукому, легочную гипертензию, портальную гипертензию, системную венозную гипертензию, систолическую

гипертензию, лабильную гипертензию; гипертензивную кардиопатию, гипертензивную нефропатию, атеросклероз, артериосклероз, васкулопатию (в том числе заболевание периферических сосудов), диабетическую нефропатию, диабетическую ретинопатию, хроническую сердечную недостаточность, кардиомиопатию, диабетическую кардиомиопатию, гломерулосклероз, коарктацию аорты, аневризму аорты, фиброз желудочков, синдром Кушинга и другие состояния избытка глюкокортикоидов, включая хроническую стероидную терапию, феохромоцитому, рениному, вторичный альдостеронизм, и другие состояния избытка минералокортикоидов, апноэ во сне, заболевание щитовидной/паращитовидной железы, сердечную недостаточность (например, нарушение систолической функции левого желудочка), инфаркт миокарда, стенокардию, инсульт, сахарный диабет (например, диабетическую нефропатию), заболевание почек, например, хроническую почечную недостаточность или диабетическую нефропатию, необязательно в контексте беременности, почечную недостаточность, например, хроническую почечную недостаточность, нарушение когнитивной функции (такое как болезнь Альцгеймера) и системный склероз (например, склеродермический почечный криз). В определенных вариантах осуществления AGT-ассоциированное заболевание включает задержку внутриутробного развития (IUGR) или задержку развития плода. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества иРНК средства, например, дцРНК, или вектора по изобретению, тем самым предотвращая по меньшей мере один симптом у субъекта, который имеет нарушение, для которого будет полезно снижение экспрессии AGT.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает использование терапевтически эффективного количества иРНК средства по изобретению для лечения субъекта, например, субъекта, которому будет полезно снижение и/или ингибирование экспрессии AGT.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает использование иРНК средства, например, дцРНК, по изобретению, направленного на ген AGT или фармацевтическую композицию, которая содержит иРНК средство, направленное на ген

AGT, при изготовлении лекарственного средства для лечения субъекта, например, субъекта, которому будет полезно снижение и/или ингибирование экспрессии AGT, такому как субъект, который имеет нарушение, для которого будет полезно снижение экспрессии AGT, например, AGT-ассоциированное заболевание, например, гипертензию, например, пограничную гипертензию (также известную как прегипертензия), первичную гипертензию (также известную как эссенциальная гипертензия или идеопатическая гипертензия), вторичную гипертензию (также известную как неэссенциальная гипертензия), гипертонический криз (также известный как злокачественная гипертензия), экстренное гипертензивное состояние, изолированную систолическую или диастолическую гипертензию, гипертензию, ассоциированную с беременностью, (например, предэклампсию, эклампсию и послеродовую предэклампсию), диабетическую гипертензию, резистентную гипертензию, рефракторную гипертензию, пароксизмальную гипертензию, реноваскулярную гипертензию (также известную как почечная гипертензия), гипертензию Голдблатта, глазную гипертензию, глаукому, легочную гипертензию, портальную гипертензию, системную венозную гипертензию, систолическую гипертензию, лабильную гипертензию; гипертензивную кардиопатию, гипертензивную нефропатию, атеросклероз, артериосклероз, васкулопатию (включая заболевание периферических сосудов), диабетическую нефропатию, диабетическую ретинопатию, хроническую сердечную недостаточность, кардиомиопатию, диабетическую кардиомиопатию, гломерулосклероз, коарктацию аорты, аневризму аорты, фиброз желудочков, синдром Кушинга и другие состояния избытка глюкокортикоидов, включая хроническую стероидную терапию, феохромоцитому, рениному, вторичный альдостеронизм, и другие состояния избытка минералокортикоидов, апноэ во сне, заболевание щитовидной/паращитовидной железы, сердечную недостаточность (например, нарушение систолической функции левого желудочка), инфаркт миокарда, стенокардию, инсульт, сахарный диабет (например, диабетическую нефропатию), заболевание почек, например, хроническую почечную недостаточность или диабетическую нефропатию, необязательно в

контексте беременности, почечную недостаточность, например, хроническую почечную недостаточность, нарушение когнитивной функции (такое как болезнь Альцгеймера) и системный склероз (например, склеродермический почечный криз). В определенных вариантах осуществления AGT-ассоциированное заболевание включает задержку внутриутробного развития (IUGR) или задержку развития плода.

В другом аспекте изобретение относится к использованию иРНК, например, дцРНК, по изобретению для предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего нарушением, для которого будет полезно снижение и/или ингибирование экспрессии AGT, таким как AGT-ассоциированное заболевание, например, гипертензия, например, пограничная гипертензия (также известная как прегипертензия), первичная гипертензия (также известная как эссенциальная гипертензия или идеопатическая гипертензия), вторичная гипертензия (также известная как неэссенциальная гипертензия), гипертонический криз (также известный как злокачественная гипертензия), экстренное гипертензивное состояние, изолированная систолическая или диастолическая гипертензия, гипертензия, ассоциированная с беременностью, (например, предэклампсия, эклампсия и послеродовая предэклампсия), диабетическая гипертензия, резистентная гипертензия, рефракторная гипертензия, пароксизмальная гипертензия, реноваскулярная гипертензия (также известная как почечная гипертензия), гипертензия Голдблатта, глазная гипертензия, глаукома, легочная гипертензия, портальная гипертензия, системная венозная гипертензия, систолическая гипертензия, лабильная гипертензия; гипертензивная кардиопатия, гипертензивная нефропатия, атеросклероз, артериосклероз, васкулопатия (в том числе заболевание периферических сосудов), диабетическая нефропатия, диабетическая ретинопатия, хроническая сердечная недостаточность, кардиомиопатия, диабетическая кардиомиопатия, гломерулосклероз, коарктация аорты, аневризма аорты, фиброз желудочков, синдром Кушинга и другие состояния избытка глюкокортикоидов, в том числе хроническая стероидная терапия, феохромоцитома, ренинома, вторичный альдостеронизм, и

другие состояния избытка минералокортикоидов, апноэ во сне, заболевание щитовидной/паращитовидной железы, сердечная недостаточность (например, нарушение систолической функции левого желудочка), инфаркт миокарда, стенокардия, инсульт, сахарный диабет (например, диабетическая нефропатия), заболевание почек, например, хроническая почечная недостаточность или диабетическая нефропатия, необязательно в контексте беременности, почечная недостаточность, например, хроническая почечная недостаточность, нарушение когнитивной функции (такое как болезнь Альцгеймера) и системный склероз (например, склеродермический почечный криз). В определенных вариантах осуществления AGT-ассоциированное заболевание включает задержку внутриутробного развития (IUGR) или задержку развития плода.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает использование иРНК средства по изобретению при изготовлении лекарственного средства для предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего нарушением, для которого будет полезно снижение и/или ингибирование экспрессии AGT, таким как AGT-ассоциированное заболевание, например, гипертензия, например, пограничная гипертензия (также известная как прегипертензия), первичная гипертензия (также известная как эссенциальная гипертензия или идеопатическая гипертензия), вторичная гипертензия (также известная как неэссенциальная гипертензия), гипертонический криз (также известный как злокачественная гипертензия), экстренное гипертензивное состояние, изолированная систолическая или диастолическая гипертензия, гипертензия, ассоциированная с беременностью, (например, предэклампсия, эклампсия и послеродовая предэклампсия), диабетическая гипертензия, резистентная гипертензия, рефракторная гипертензия, пароксизмальная гипертензия, реноваскулярная гипертензия (также известная как почечная гипертензия), гипертензия Голдблатта, глазная гипертензия, глаукома, легочная гипертензия, портальная гипертензия, системная венозная гипертензия, систолическая гипертензия, лабильная гипертензия; гипертензивная кардиопатия,

гипертензивная нефропатия, атеросклероз, артериосклероз, васкулопатия (в том числе заболевание периферических сосудов), диабетическая нефропатия, диабетическая ретинопатия, хроническая сердечная недостаточность, кардиомиопатия, диабетическая кардиомиопатия, гломерулосклероз, коарктация аорты, аневризма аорты, фиброз желудочков, синдром Кушинга и другие состояния избытка глюкокортикоидов, в том числе хроническая стероидная терапия, феохромоцитома, ренинома, вторичный альдостеронизм, и другие состояния избытка минералокортикоидов, апноэ во сне, заболевание щитовидной/паращитовидной железы, сердечная недостаточность (например, нарушение систолической функции левого желудочка), инфаркт миокарда, стенокардия, инсульт, сахарный диабет (например, диабетическая нефропатия), заболевание почек, например, хроническая почечная недостаточность или диабетическая нефропатия, необязательно в контексте беременности, почечная недостаточность, например, хроническая почечная недостаточность, нарушение когнитивной функции (такое как болезнь Альцгеймера) и системный склероз (например, склеродермический почечный криз). В определенных вариантах осуществления AGT-ассоциированное заболевание включает задержку внутриутробного развития (IUGR) или задержку развития плода.

В одном из вариантов осуществления иРНК средство, направленное на AGT, вводят субъекту, который имеет AGT-ассоциированное заболевание, так, что происходит снижение уровней AGT, например, в клетке, ткани, крови или другой ткани или текучем веществе субъекта по меньшей мере приблизительно на 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%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 62%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере приблизительно на 99% или больше, когда дцРНК средство вводят субъекту. В предпочтительных вариантах

осуществления происходит снижение уровня AGT по меньшей мере 20%.

Способы и использование по изобретению включают введение композиции, описанной в настоящем документе, так, что снижают экспрессию целевого гена AGT, например, в течение приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 18, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76 или приблизительно 80 часов. В одном из вариантов осуществления экспрессию целевого гена AGT снижают в течение продолжительного периода, например, по меньшей мере приблизительно двое, трое, четверо, пятеро, шестеро, семеро суток или больше, например, приблизительно одна неделя, две недели, три недели или приблизительно четыре недели или дольше.

Введение дцРНК в соответствии со способами и использование по изобретению может вести к снижению тяжести, признаков, симптомов и/или маркеров таких заболеваний или нарушений у пациента с AGT-ассоциированным заболеванием. Под «снижением» в этом контексте понимают статистически значимое снижение такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или приблизительно 100%. В предпочтительных вариантах осуществления уровень AGT снижают по меньшей мере на 20%.

Эффект лечения или предотвращения заболевания можно оценивать, например, посредством измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптомов, уменьшения боли, качества жизни, дозы лекарственного средства, необходимой для поддержания лечебного эффекта, уровня маркера заболевания или какого-либо другого параметра, поддающегося измерению, подходящего для данного заболевания, подлежащему лечению или направленному воздействию для предотвращения. Специалист в данной области без труда способен осуществлять мониторинг эффекта лечения или предотвращения посредством измерения какого-либо одного из таких параметров или какой-либо комбинации параметров. Например, эффект лечения гипертензии при дислипидемии можно оценивать, например, посредством периодического мониторинга кровяного давления. Сравнение

последних показаний с начальными показаниями предоставляет врачу указание на то, является ли лечение эффективным. Специалист в данной области без труда сможет осуществлять мониторинг эффекта лечения или предотвращения посредством измерения какого-либо одного из таких параметров или какой-либо комбинации параметров. Применительно к введению иРНК, направленной на АГТ, или ее фармацевтической композиции, «эффективен против» АГТ-ассоциированного заболевания указывает на то, что введение клинически подходящим образом ведет к положительному эффекту для по меньшей мере статистически значимой фракции пациентов, такому как улучшение симптомов, излечение, снижение заболевания, продление срока жизни, улучшение качества жизни или другой эффект, общепризнанный в качестве положительного врачами, знакомыми с лечением АГТ-ассоциированного заболевания и связанных причин.

Лечебный или профилактический эффект очевиден, когда имеет место статистически значимое улучшение одного или нескольких параметров состояния заболевания или невозможность ухудшения или развития симптомов там, где иначе они предполагались. В качестве примера, благоприятное изменение по меньшей мере на 10% в поддающемся измерению параметре заболевания и предпочтительно по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50% или больше может указывать на эффективное лечение. Эффект для данного иРНК лекарственного средства или состава лекарственного средства также можно корректировать с использованием экспериментальной модели на животных для данного заболевания, как известно в данной области. При использовании экспериментальной модели на животных, эффект лечения подтверждают, когда наблюдают статистически значимое снижение маркера или симптома. Подходящие модели на животных для заболевания, ассоциированного с ангиотензиногеном, например, гипертензии, включают, например, генетические модели гипертензии, например, ВРН/2 мыши, крысы со спонтанной гипертензией (SHR), крысы Dahl, чувствительные к соли (DS), трансгенные крысы TGR(mREN2)27, у которых супрессирован эндогенный почечный ренин, и крысы с пограничной гипертензией (BHR), экспериментально индуцированные модели гипертензии,

например, экспериментально индуцированные модели почечной гипертензии модель Голдблатта почечной индуцированной экспериментальной гипертензии, модели субтотальной нефректомии и индуцированная ангиотензином II гипертензия (см., например, Dornal and Silva (2011) J Biosci 36:731). Подходящие модели на животных для гипертензии, ассоциированной с беременностью, включают, например, генетические модели, например, мыши с пограничной гипертензией (например, мыши VRH/5), крысы и/или мыши, несущие трансген, кодирующий ренин человека, и трансген, кодирующий ангиотензиноген человека, и экспериментально индуцированные модели, например, модели с инфузией sFlt-1, AT₁-AA-индуцированные модели, модели со сниженным давлением маточно-плацентарной перфузии (RUPP) (см., например, McCarthy, et al. (2011) Placenta 32:413-419).

Субъектам можно вводить терапевтическое количество иРНК, такое как приблизительно 0,01 мг/кг, 0,02 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,04 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,15 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,35 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,45 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,55 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,65 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,75 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,85 мг/кг, 0,9 мг/кг, 0,95 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,1 мг/кг, 1,2 мг/кг, 1,3 мг/кг, 1,4 мг/кг, 1,5 мг/кг, 1,6 мг/кг, 1,7 мг/кг, 1,8 мг/кг, 1,9 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,1 мг/кг, 2,2 мг/кг, 2,3 мг/кг, 2,4 мг/кг, 2,5 мг/кг дцРНК, 2,6 мг/кг дцРНК, 2,7 мг/кг дцРНК, 2,8 мг/кг дцРНК, 2,9 мг/кг дцРНК, 3,0 мг/кг дцРНК, 3,1 мг/кг дцРНК, 3,2 мг/кг дцРНК, 3,3 мг/кг дцРНК, 3,4 мг/кг дцРНК, 3,5 мг/кг дцРНК, 3,6 мг/кг дцРНК, 3,7 мг/кг дцРНК, 3,8 мг/кг дцРНК, 3,9 мг/кг дцРНК, 4,0 мг/кг дцРНК, 4,1 мг/кг дцРНК, 4,2 мг/кг дцРНК, 4,3 мг/кг дцРНК, 4,4 мг/кг дцРНК, 4,5 мг/кг дцРНК, 4,6 мг/кг дцРНК, 4,7 мг/кг дцРНК, 4,8 мг/кг дцРНК, 4,9 мг/кг дцРНК, 5,0 мг/кг дцРНК, 5,1 мг/кг дцРНК, 5,2 мг/кг дцРНК, 5,3 мг/кг дцРНК, 5,4 мг/кг дцРНК, 5,5 мг/кг дцРНК, 5,6 мг/кг дцРНК, 5,7 мг/кг дцРНК, 5,8 мг/кг дцРНК, 5,9 мг/кг дцРНК, 6,0 мг/кг дцРНК, 6,1 мг/кг дцРНК, 6,2 мг/кг дцРНК, 6,3 мг/кг дцРНК, 6,4 мг/кг дцРНК, 6,5 мг/кг дцРНК, 6,6 мг/кг дцРНК, 6,7 мг/кг дцРНК, 6,8 мг/кг дцРНК, 6,9 мг/кг дцРНК, 7,0 мг/кг дцРНК, 7,1 мг/кг дцРНК, 7,2 мг/кг дцРНК, 7,3 мг/кг дцРНК, 7,4 мг/кг дцРНК,

7,5 мг/кг дцРНК, 7,6 мг/кг дцРНК, 7,7 мг/кг дцРНК, 7,8 мг/кг дцРНК, 7,9 мг/кг дцРНК, 8,0 мг/кг дцРНК, 8,1 мг/кг дцРНК, 8,2 мг/кг дцРНК, 8,3 мг/кг дцРНК, 8,4 мг/кг дцРНК, 8,5 мг/кг дцРНК, 8,6 мг/кг дцРНК, 8,7 мг/кг дцРНК, 8,8 мг/кг дцРНК, 8,9 мг/кг дцРНК, 9,0 мг/кг дцРНК, 9,1 мг/кг дцРНК, 9,2 мг/кг дцРНК, 9,3 мг/кг дцРНК, 9,4 мг/кг дцРНК, 9,5 мг/кг дцРНК, 9,6 мг/кг дцРНК, 9,7 мг/кг дцРНК, 9,8 мг/кг дцРНК, 9,9 мг/кг дцРНК, 9,0 мг/кг дцРНК, 10 мг/кг дцРНК, 15 мг/кг дцРНК, 20 мг/кг дцРНК, 25 мг/кг дцРНК, 30 мг/кг дцРНК, 35 мг/кг дцРНК, 40 мг/кг дцРНК, 45 мг/кг дцРНК или приблизительно 50 мг/кг дцРНК. Значения и диапазоны между указанными значениями также предназначены в качестве части данного изобретения.

В определенных вариантах осуществления, например, когда композиция по изобретению содержит дцРНК, как описано в настоящем документе, и липид, субъектам можно вводить терапевтическое количество иРНК, такое как приблизительно от 0,01 мг/кг приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 0,01 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 0,05 мг/кг приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 0,05 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 0,1 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 0,2 мг/кг приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 0,2 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 0,3 мг/кг приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 0,3 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 0,4 мг/кг приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 0,4 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 0,5 мг/кг приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 0,5 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 1 мг/кг приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 1 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 1,5 мг/кг приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 1,5 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 2 мг/кг приблизительно до 2,5 мг/кг, приблизительно от 2 мг/кг приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 3 мг/кг

приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 3 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 3,5 мг/кг
 приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 4 мг/кг
 приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 4,5 мг/кг
 приблизительно до 5 мг/кг, приблизительно от 4 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 4,5 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 5 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 5,5 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 6 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 6,5 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 7 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 7,5 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 8 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 8,5 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг, приблизительно от 9 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг или приблизительно от 9,5 мг/кг
 приблизительно до 10 мг/кг. Значения и диапазоны между
 указанными значениями также предназначены в качестве части
 данного изобретения.

Например, дцРНК можно вводить в дозе приблизительно 0,1,
 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4,
 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7,
 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,
 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3,
 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6,
 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9,
 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2,
 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или приблизительно 10 мг/кг.
 Значения и диапазоны между указанными значениями также
 предназначены в качестве части данного изобретения.

В других вариантах осуществления, например, когда
 композиция по изобретению содержит дцРНК, как описано в
 настоящем документе, и N-ацетилгалактозамин, субъектам можно
 вводить терапевтическое количество иРНК, такое как доза
 приблизительно от 0,1 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно
 от 0,25 приблизительно до 50 мг/кг, приблизительно от 0,5

приблизительно от 1 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 1,5 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 2 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 2,5 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 3 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 3,5 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 4 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 4,5 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 5 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 7,5 приблизительно до 20 мг/кг, приблизительно от 10 приблизительно до 20 мг/кг или от приблизительно 15 приблизительно до 20 мг/кг. В одном из вариантов осуществления, когда композиция по изобретению содержит дцРНК, как описано в настоящем документе, и N-ацетилгалактозамин, субъектам можно вводить терапевтическое количество приблизительно от 10 приблизительно до 30 мг/кг дцРНК. Значения и диапазоны между указанными значениями также предназначены в качестве части данного изобретения.

Например, субъектам можно вводить терапевтическое количество иРНК, такое как приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или приблизительно 50 мг/кг. Значения и диапазоны между указанными значениями также предназначены в качестве части данного изобретения.

В определенных вариантах осуществления, например, когда средство из двухцепочечной РНКи содержит модификацию (например, один или несколько мотивов из трех идентичных модификаций в трех

последовательных нуклеотидах), в том числе один такой мотив в сайте расщепления средства или около него, шесть фосфориоатных связей и лиганд, такое средство вводят в дозе приблизительно от 0,01 приблизительно до 0,5 мг/кг, приблизительно от 0,01 приблизительно до 0,4 мг/кг, приблизительно от 0,01 приблизительно до 0,3 мг/кг, приблизительно от 0,01 приблизительно до 0,2 мг/кг, приблизительно от 0,01 приблизительно до 0,1 мг/кг, приблизительно от 0,01 мг/кг приблизительно до 0,09 мг/кг, приблизительно от 0,01 мг/кг приблизительно до 0,08 мг/кг, приблизительно от 0,01 мг/кг приблизительно до 0,07 мг/кг, приблизительно от 0,01 мг/кг приблизительно до 0,06 мг/кг, приблизительно от 0,01 мг/кг приблизительно до 0,05 мг/кг, приблизительно от 0,02 приблизительно до 0,5 мг/кг, приблизительно от 0,02 приблизительно до 0,4 мг/кг, приблизительно от 0,02 приблизительно до 0,3 мг/кг, приблизительно от 0,02 приблизительно до 0,2 мг/кг, приблизительно от 0,02 приблизительно до 0,1 мг/кг, приблизительно от 0,02 мг/кг приблизительно до 0,09 мг/кг, приблизительно от 0,02 мг/кг приблизительно до 0,08 мг/кг, приблизительно от 0,02 мг/кг приблизительно до 0,07 мг/кг, приблизительно от 0,02 мг/кг приблизительно до 0,06 мг/кг, приблизительно от 0,02 мг/кг приблизительно до 0,05 мг/кг, приблизительно от 0,03 приблизительно до 0,5 мг/кг, приблизительно от 0,03 приблизительно до 0,4 мг/кг, приблизительно от 0,03 приблизительно до 0,3 мг/кг, приблизительно от 0,03 приблизительно до 0,2 мг/кг, приблизительно от 0,03 приблизительно до 0,1 мг/кг, приблизительно от 0,03 мг/кг приблизительно до 0,09 мг/кг, приблизительно от 0,03 мг/кг приблизительно до 0,08 мг/кг, приблизительно от 0,03 мг/кг приблизительно до 0,07 мг/кг, приблизительно от 0,03 мг/кг приблизительно до 0,06 мг/кг, приблизительно от 0,03 мг/кг приблизительно до 0,05 мг/кг, приблизительно от 0,04 приблизительно до 0,5 мг/кг, приблизительно от 0,04 приблизительно до 0,4 мг/кг, приблизительно от 0,04 приблизительно до 0,3 мг/кг, приблизительно от 0,04

приблизительно до 0,2 мг/кг, приблизительно от 0,04
приблизительно до 0,1 мг/кг, приблизительно от 0,04 мг/кг
приблизительно до 0,09 мг/кг, приблизительно от 0,04 мг/кг
приблизительно до 0,08 мг/кг, приблизительно от 0,04 мг/кг
приблизительно до 0,07 мг/кг, приблизительно от 0,04 мг/кг
приблизительно до 0,06 мг/кг, приблизительно от 0,05
приблизительно до 0,5 мг/кг, приблизительно от 0,05
приблизительно до 0,4 мг/кг, приблизительно от 0,05
приблизительно до 0,3 мг/кг, приблизительно от 0,05
приблизительно до 0,2 мг/кг, приблизительно от 0,05
приблизительно до 0,1 мг/кг, приблизительно от 0,05 мг/кг
приблизительно до 0,09 мг/кг, приблизительно от 0,05 мг/кг
приблизительно до 0,08 мг/кг или приблизительно от 0,05 мг/кг
приблизительно до 0,07 мг/кг. Значения и диапазоны между
приведенными выше указанными значениями также предназначены в
качестве части данного изобретения, например, РНКи средство
можно вводить у субъекту в дозе приблизительно от 0,015 мг/кг
приблизительно до 0,45 мг/кг.

Например, РНКи средство, например, РНКи средство в
фармацевтической композиции, можно вводить в дозе приблизительно
0,01 мг/кг, 0,0125 мг/кг, 0,015 мг/кг, 0,0175 мг/кг, 0,02 мг/кг,
0,0225 мг/кг, 0,025 мг/кг, 0,0275 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,0325
мг/кг, 0,035 мг/кг, 0,0375 мг/кг, 0,04 мг/кг, 0,0425 мг/кг,
0,045 мг/кг, 0,0475 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,0525 мг/кг, 0,055
мг/кг, 0,0575 мг/кг, 0,06 мг/кг, 0,0625 мг/кг, 0,065 мг/кг,
0,0675 мг/кг, 0,07 мг/кг, 0,0725 мг/кг, 0,075 мг/кг, 0,0775
мг/кг, 0,08 мг/кг, 0,0825 мг/кг, 0,085 мг/кг, 0,0875 мг/кг, 0,09
мг/кг, 0,0925 мг/кг, 0,095 мг/кг, 0,0975 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,125
мг/кг, 0,15 мг/кг, 0,175 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,225 мг/кг, 0,25
мг/кг, 0,275 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,325 мг/кг, 0,35 мг/кг, 0,375
мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,425 мг/кг, 0,45 мг/кг, 0,475 мг/кг или
приблизительно 0,5 мг/кг. Значения между приведенными выше
указанными значениями также предназначены в качестве части
данного изобретения.

иРНК можно вводить посредством внутривенной инфузии в
течение периода времени, например, в течение периода 5, 6, 7, 8,

9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или приблизительно 25 минут. Введение можно повторять, например, на регулярной основе, например, раз в неделю, раз в две недели (т. е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше. После начальной схемы лечения, лечение можно вводить на менее частой основе. Например, после введения раз в неделю или раз в две недели в течение трех месяцев, введение можно повторять один раз в месяц, в течение шести месяцев или года или дольше.

Введение иРНК может снижать уровни АГТ, например, в клетке, ткани, крови, моче или другом компартменте пациента по меньшей мере приблизительно на 5%, 6%, 7%, 8%, 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%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере приблизительно на 99% или больше.

Перед введением полной дозы иРНК, пациентам можно вводить меньшую дозу, такую как 5% инфузия, и осуществлять мониторинг нежелательных эффектов, таких как аллергическая реакция. В другом примере у пациента можно осуществлять мониторинг нежелательных иммуностимуляторных эффектов, таких как увеличенные уровни цитокинов (например, TNF- α или INF- α).

Вследствие ингибиторных эффектов, оказываемых на экспрессию АГТ, композиция в соответствии с изобретением или фармацевтическая композиция, полученная из нее, может улучшать качество жизни.

иРНК по изобретению можно вводить в «голой» форме, где средство из модифицированной или немодифицированной иРНК непосредственно суспендируют в водном или подходящем буферном растворителе, в виде «свободной иРНК». Свободную иРНК вводят в отсутствие фармацевтической композиции. Свободная иРНК может

быть в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может содержать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или какое-либо их сочетание. В одном из вариантов осуществления буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буфер (PBS). pH и осмолярность буферного раствора, содержащего иРНК, можно корректировать так, чтобы он подходил для введения субъекту.

Альтернативно, иРНК по изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, такой как дцРНК липосомный состав.

Субъектами, которым будет полезно снижение и/или ингибирование экспрессии AGT гена, являются те, которые имеют AGT-ассоциированное заболевание или нарушение, как описано в настоящем документе.

Лечение субъекта, которому будет полезно снижение и/или ингибирование экспрессии AGT гена, включает терапевтическое и профилактическое лечение.

Изобретение дополнительно предусматривает способы и использование иРНК средства или его фармацевтической композиции для лечения субъекта, которому будет полезно снижение и/или ингибирование экспрессии AGT, например, субъекта, который имеет AGT-ассоциированное заболевание, в комбинации с другими фармацевтическими средствами и/или другими терапевтическими способами, например, с использованием известных фармацевтических средств и/или известных терапевтических способов, например, таких как те, которые в настоящее время используют для лечения этих нарушений. Например, в определенных вариантах осуществления иРНК, направленную на AGT, вводят в комбинации, например, со средством, которое можно использовать при лечении AGT-ассоциированного заболевания, как описано в другом месте в настоящем документе. Например, дополнительные терапевтические средства и терапевтические способы, подходящие для лечения субъекта, для которого будет полезно снижение экспрессии AGT, например, субъекта, который имеет AGT-ассоциированное заболевание, включают ангиопластику, аортопочечный анастомоз, денервацию почки, чрезкожную транслюминальную почечную ангиопластику (PTRA) и стентирование, хирургическую

реваскуляризацию, катетерную почечную симпатическую денервацию и хирургическое удаление феохромоцитомы или рениномы, адренэктомию, лечение диуретиком, например, диуретиком тиазидового типа, таким как хлортиазид, гидрохлортиазид, хлорталидон, метолазон и индапамид, калийсберегающим диуретиком, таким как триамтерен и амилорид, петлевым диуретиком, таким как фуросемид, торасемид, этакриновая кислота и буметанид; ингибитором ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ), таким как фозиноприл, каптоприл, рамиприл, эналаприл, лизиноприл и хинаприл; антагонистом рецептора ангиотензина II (также известным как блокатор рецептора ангиотензина), например, лозартан, валсартан, олмесартан, эпросартан и азилсартан; бета-блокатором, таким как селективный бета-1 блокатор, таким как атенолол, метопролол, пропранолол, бисопролол и тимолол, бета-блокатором альфа-1 рецептора, таким как лабеталол, эсмолол и карведилол, внутренним симпатомиметическим бета-блокатором, например, ацебутололом и пиндололом; вазодилататором, таким как гидралазин, миноксидил, нитропруссид натрия и нитроглицерин; блокатором кальциевых каналов, таким как нифедипин, клевидипин, амлодипин, фелодипин, дилтиазем, никардипин и верапамил; антагонистом альдостерона, таким как селективный антагонист альдостерона, например, эплеренон и спиронолактон; альфа₂-агонистом, таким как альфа₂-агонист центрального действия, таким как метилдопа, клонидин и гуанфацин, ингибитором ренина, например, алискиреном; альфа-блокатором, таким как празосин, теразозин и доксазозин; адренергическим средством периферического действия, например, резерпином; избирательным частичным агонистом рецептора D₁, например, мезилатом фенолдопама; неизбирательным альфа-адренергическим антагонистом, например, фентоламином; синтетическим стероидным антиминералкортикоидным средством, например, спиронолактоном, или комбинацией любых приведенных выше; и терапевтическим средством, сформулированным в виде комбинации средств, например, комбинации амлодипина/беназеприла (Lotrel), амлодипина/олмесартана (Azor), амлодипина/телмисартана (Twynsta), амлодипина/валсартана (Exforge),

амлодипина/валсартана/гидрохлортиазида (Exforge HCT),
 амлодипина/алискирена (Tekamlo),
 амлодипина/алискирена/гидрохлортиазида (Amturnide),
 олмесартана/амлодипина/гидрохлортиазида (Tribenzor),
 трандолаприла/верапамила (Tarka), беназеприла/гидрохлортиазида
 (Lotensin HCT), каптоприла/гидрохлортиазида (Capozide),
 эналаприла/гидрохлортиазида (Vaseretic),
 фозиноприла/гидрохлортиазида, лизиноприла/гидрохлортиазида
 (Prinzide, Zestoretic), мозексиприла/гидрохлортиазида (Uniretic),
 хинаприла/гидрохлортиазида (Accuretic),
 кандесартана/гидрохлортиазида (Atacand HCT),
 эпросартана/гидрохлортиазида (Teveten HCT),
 ирбесартана/гидрохлортиазида (Avalide),
 лозартана/гидрохлортиазида (Hyzaar),
 олмесартана/гидрохлортиазида (Benicar HCT),
 телмисартана/гидрохлортиазида (Micardis HCT),
 валсартана/гидрохлортиазида (Diovan HCT), атенолола/хлорталидона
 (Tenoretic), бисопролола/гидрохлортиазида (Ziac),
 метопролола/гидрохлортиазида (Lopressor HCT),
 надолола/бендрофлуметиазида (Corzide),
 пропранолола/гидрохлортиазида, алискирена/гидрохлортиазида
 (Tekturna HCT), клонидина/хлорталидона (Clorpres),
 спиронолактона/гидрохлортиазида (Aldactazide),
 триамтерена/гидрохлортиазида (Dyazide, Maxzide),
 метилдопы/гидрохлортиазида и амилорида/гидрохлортиазида или
 другими терапевтическими средствами для лечения АГТ-
 ассоциированного заболевания.

иРНК средство и дополнительное терапевтическое средство
 и/или лечение можно вводить одновременно и/или в одной и той же
 комбинации, например, парентерально, или дополнительное
 терапевтическое средство можно вводить в качестве части
 отдельной композиции или в отдельные моменты времени и/или
 другим способом, известным в данной области или описанным в
 настоящем документе.

Настоящее изобретение также относится к способам
 использования иРНК средства по изобретению и/или композиции,

содержащей иРНК средство по изобретению, для того, чтобы снижать и/или ингибировать экспрессию AGT в клетке. В других аспектах настоящее изобретение предусматривает иРНК по изобретению и/или композицию, которая содержит иРНК по изобретению, для использования в снижении и/или ингибировании экспрессии AGT в клетке. В других аспектах предусмотрено использование иРНК по изобретению и/или композиции, которая содержит иРНК по изобретению, для изготовления лекарственного средства для снижения и/или ингибирования экспрессии AGT в клетке.

Способы и использование включают приведение клетки в контакт с иРНК, например, дцРНК, по изобретению и поддержание клетки в течение периода времени, достаточного для достижения деградации мРНК транскрипта гена AGT, тем самым ингибируя экспрессию гена AGT в клетке.

Снижение экспрессии гена можно оценивать с помощью любых способов, известных в данной области. Например, снижение экспрессии AGT можно определять посредством определения уровня экспрессии мРНК AGT, используя способы, рутинные для специалиста в данной области, например, «нозерн»-блоттинг, qRT-PCR, посредством определения уровня белка AGT с использованием способов, рутинных для специалиста в данной области, таких как вестерн-блоттинг, иммунологические способы, способы проточной цитометрии, ELISA, и/или посредством определения биологической активности AGT.

В способах и при использовании по изобретению клетку можно приводить в контакт *in vitro* или *in vivo*, т. е., клетка может находиться внутри субъекта.

Клетка, подходящая для лечения с использованием способов по изобретению, может представлять собой любую клетку, которая экспрессирует ген AGT. Клетка, пригодная для использования в способах и при использовании по изобретению, может представлять собой клетку млекопитающего, например, клетку примата (такую как клетка человека или клетка примата, не являющегося человеком, например, клетка мартышки или клетка шимпанзе), клетку не примата (такую как клетка коровы, клетка свиньи, клетка верблюда, клетка ламы, клетка лошади, клетка козы, клетка

кролика, клетка овцы, клетка хомяка, клетка морской свинки, клетка кошки, клетка собаки, клетка крысы, клетка мыши, клетка льва, клетка тигра, клетка медведя или клетка буйвола), клетку птицы (например, клетку утки или клетку гуся) или клетку кита. В одном из вариантов осуществления клетка представляет собой клетку человека, например, клетку печени человека.

Экспрессию AGT можно ингибировать в клетке по меньшей мере приблизительно на 5%, 6%, 7%, 8%, 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%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или приблизительно 100%. В предпочтительных вариантах осуществления уровень AGT снижают по меньшей мере на 20%.

Способы и использование по изобретению *in vivo* могут включать введение субъекту композиции, содержащей иРНК, где иРНК содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна по меньшей мере части РНК транскрипта гена AGT млекопитающего, подлежащего лечению. Когда организмом, подлежащим лечению, является человек, композицию можно вводить с помощью любого средства, известного в данной области, включая в качестве неограничивающих примеров подкожный, внутривенный, оральный, интраперитонеальный или парентеральный путь, в том числе внутрочерепное (например, внутримозговое, интрапаренхимальное и интратекальное), внутримышечное, трансдермальное введение, введение в дыхательные пути (аэрозоль), назальное, ректальное и топическое (в том числе буккальное и сублингвальное) введение. В определенных вариантах осуществления композиции вводят посредством подкожной или внутривенной инфузии или инъекции.

В некоторых вариантах осуществления введение происходит через инъекцию депо. Инъекция депо может высвобождать иРНК согласованно в течение длительного периода времени. Таким

образом, инъекция депо позволяет снижать частоту дозирования, необходимую для достижения желаемого эффекта, например, желаемого ингибирования АГТ, или терапевтического или профилактического эффекта. инъекция депо также позволяет обеспечивать более согласованные концентрации в сыворотке. Инъекции депо могут включать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции. В предпочтительных вариантах осуществления инъекция депо представляет собой подкожную инъекцию.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют через насос. Насос может представлять собой внешний насос или хирургически имплантированный насос. В определенных вариантах осуществления насос представляет собой подкожно имплантированный осмотический насос. В других вариантах осуществления насос представляет собой инфузионный насос. Инфузионный насос можно использовать для внутривенных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. В предпочтительных вариантах осуществления инфузионный насос представляет собой подкожный инфузионный насос. В других вариантах осуществления насос представляет собой хирургически имплантированный насос, который доставляет иРНК в печень.

Изначально можно вводить более высокую дозу (т. е., загрузочную дозу), после чего следует более низкая доза в течение длительного периода времени.

Способ введения можно выбирать на основании того, является ли желательным местное или системное лечение, и на основании области, подлежащей лечению. Путь и место введения можно выбирать для усиления направленного воздействия.

В одном из аспектов настоящее изобретение также относится к способам ингибирования экспрессии гена АГТ у млекопитающих, например, у человека. Настоящее изобретение также относится к композиции, которая содержит иРНК, например, дцРНК, которая направлена на ген АГТ в клетке млекопитающего, для использования при ингибировании экспрессии гена АГТ у млекопитающего. В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает использование иРНК, например, дцРНК, которая направлена на ген АГТ в клетке

млекопитающего, при изготовлении лекарственного средства для ингибирования экспрессии гена AGT у млекопитающего.

Способы и использование включают введение млекопитающему, например, человеку, композиции, которая содержит иРНК, например, дцРНК, которая направлена на ген AGT в клетке млекопитающего, и поддержание млекопитающего в течение периода времени, достаточного для достижения деградации мРНК транскрипта гена AGT, тем самым ингибируя экспрессию гена AGT у млекопитающего.

Снижение экспрессии гена можно оценивать в образце периферической крови субъекта, которому вводили иРНК, с помощью любых способов, известных в данной области, например, qRT-PCR, описанных в настоящем документе. Снижение образования белка можно оценивать с помощью любых способов, известных в данной области, и с помощью способов, например, ELISA или вестерн-блоттинга, описанных в настоящем документе. В одном из вариантов осуществления образец пункционной биопсии печени служит в качестве тканевого материала для мониторинга снижения экспрессии гена и/или белка AGT. В другом варианте осуществления образец крови служит в качестве тканевого материала для мониторинга снижения экспрессии гена и/или белка AGT.

В одном из вариантов осуществления верификацию RISC-опосредованного расщепления мишени *in vivo* после введения иРНК средства выполняют посредством выполнения 5'-RACE или модификаций протокола, как известно в данной области (Lasham A et al., (2010) *Nucleic Acid Res.*, 38 (3) p-e19) (Zimmermann et al. (2006) *Nature* 441: 111-4).

Это изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует толковать в качестве ограничения. Полное содержание всех литературных источников, патентов и опубликованных патентных заявок, цитированных на всем протяжении этой заявки, а также фиг. и список последовательностей настоящим включены в данный документ посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. иРНК Синтез

Источник реактивов

Если в настоящем документе источник реактива не приведен конкретно, такой реактив можно получать от любого поставщика реактивов для молекулярной биологии с качеством/стандартом чистоты для применения в молекулярной биологии.

Транскрипты

Конструирование миРНК осуществляли для того, чтобы идентифицировать миРНК, направленные на транскрипты AGT человека (*Homo sapiens*), яванского макака (*Macaca fascicularis*; в дальнейшем «супо»), мыши (*Mus musculus*) и крысы (*Rattus norvegicus*), аннотированные в базе данных NCBI Gene (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/). В конструкции использоавли следующие транскрипты из NCBI: человек - NM_000029.3; обезьяна - AB170313.1; мышь - NM_007428.3. Транскрипт яванского макака продлевали с использованием последовательности, полученной из библиотеки кДНК, извлеченной из печени. Из-за высокой дивергенции последовательностей у приматов и грызунов, миРНК дуплексы конструировали в отдельных партиях, включая в качестве неограничивающих примеров партии, содержащие дуплексы, совмещающие только транскрипты человека и обезьяны и только транскрипт мыши. Все сконструированные миРНК дуплексы имели 100% идентичность с перечисленными транскриптом человека и транскриптами других видов, рассматриваемых в каждой партии конструкций.

Конструирование, специфичность и предсказание эффекта миРНК

Предсказанную специфичность всех возможных 19-членных олигомеров предсказывали по каждой последовательности. Затем отбирали кандидатные 19-членные олигомеры, которые не содержали повторы длиннее семи нуклеотидов. Эти кандидатные 706 миРНК человека/обезьяны и 1815 миРНК мыши использовали в исчерпывающем поиске среди подходящих транскриптомов (которые определены как набор записей NM_ и XM_ в наборах NCBI Refseq человека, обезьяны или мыши), используя исчерпывающий «лобовой» алгоритм, реализованный в скрипте на языке Python «BruteForce.py». Затем скрипт осуществлял парсинг выравниваний транскриптов и олигомеров для того, чтобы генерировать оценку на основании положения и числа несовпадений между миРНК и каким-либо

потенциальным «внецелевым» транскриптом. «Внецелевую» оценку делали весовой для того, чтобы подчеркнуть различия в «инициирующей области» миРНК, в положениях 2-9 от 5'-конца молекулы. Каждой паре олигонуклеотид-транскрипт из лобового поиска присваивали оценку несовпадения посредством суммирования индивидуальных оценок несовпадения; несовпадения в положениях 2-9 считали как 2,8, несовпадения в положениях в сайте расщепления 10-11 считали как 1,2 и несовпадения в области 12-19 считали как 1,0. Дополнительное внецелевое предсказание осуществляли посредством сравнения частоты гептамеров и октамеров, полученных из 3 отдельных гексамеров из каждого олигомера, полученных из иницирующей области. Гексамеры из положений 2-7 относительно 5'-старта используют для того, чтобы создавать 2 гептамеры и один октамер. «Гептамер1» создавали посредством добавления 3' А к гексамеру; «гептамер2» создавали посредством добавления 5' А к гексамеру; октамер создавали посредством добавления А к обоим 5'-и 3'-концам гексамера. Предварительно вычисляли частоту октамеров и гептамеров в совокупности 3'-нетранслируемых областей человека, обезьяны или мыши (которые определяли как подпоследовательность транскриптома из базы данных NCBI Refseq, где конец кодирующей области, «CDS», четко определен). Частоту октамеров нормализовали по частоте гептамеров, используя медианное значение из диапазона частот октамеров. Затем вычисляли «mirSeedScore» посредством вычисления суммы ((3 × нормализованное число октамеров) + (2 × число гептамеров2) + (1 × число гептамеров1)).

Обе цепи миРНК относили к определенной категории специфичности в соответствии с вычисленными оценками: оценка выше 3 определяет высоко специфичную категорию, оценка 3 определяет специфичную категорию и оценка между 2,2 и 2,8 определяет умеренно специфичную категорию. Дуплексы сортировали по специфичности антисмысловой цепи. Отбирали дуплексы из наборов человека/обезьяны и мыши, антисмысловые олигонуклеотиды которых не содержали GC в первом положении, не содержали G в

двух положениях 13 и 14 и имели 3 или больше U или A в иницирующей области (характеристики дуплексов с высоким предсказанным эффектом).

Кандидатные дуплексы, конъюгированные с GalNAc, 21 и 23 нуклеотида в длину на смысловой и антисмысловой цепях, соответственно, конструировали посредством удлинения антисмысловых 19-членных олигомеров на четыре дополнительных нуклеотида в 3'-направлении (сохраняя идеальную комплементарность с целевым транскриптом). Смысловую цепь определяли как обратный комплемент первых 21 нуклеотидов антисмыслового 23-членного олигомера. Отбирали дуплексы, которые сохраняли идеальное совпадение с транскриптами всех выбранных видов по всем 23 нуклеотидам.

Отбор последовательностей миРНК

Синтезировали всего 117 смысловых и 117 антисмысловых, полученных у человека/обезьяны, и 42 смысловых и 42 антисмысловых, полученных у мыши, 19-членных миРНК олигомера и формировали дуплексы, конъюгированные с GalNAc. Синтезировали всего 38 смысловых и 38 антисмысловых, полученных у человека/обезьяны, 21/23-членных олигомеров и всего 26 21/23-членных олигомеров мыши и формировали дуплексы, конъюгированные с GalNAc.

Подробный список немодифицированных последовательностей 19-членных смысловой и антисмысловой цепей AGT представлен в таблице 3.

Подробный список модифицированных последовательностей 19-членных смысловой и антисмысловой цепей AGT представлен в таблице 4.

Подробный список немодифицированных последовательностей 21/23-членных смысловой и антисмысловой цепей AGT представлен в таблице 7.

Подробный список модифицированных последовательностей 21/23-членных смысловой и антисмысловой цепей AGT представлен в таблице 8.

Подробный список немодифицированных последовательностей 19-

членных смысловой и антисмысловой цепей AGT представлен в таблице 11.

Подробный список немодифицированных последовательностей 21/23-членных смысловой и антисмысловой цепей AGT представлен в таблице 13.

Подробный список модифицированных последовательностей 21/23-членных смысловой и антисмысловой цепей AGT представлен в таблице 15.

Синтез миРНК

Общая процедура синтеза РНК в малом и среднем масштабе

РНК олигонуклеотиды синтезируют в масштабах 0,2-500 мкмоль, используя коммерчески доступный 5'-O-(4,4'-диметокситритил)-2'-O-т-бутилдиметилсилил-3'-O-(2-цианоэтил-N,N-диизопропил)фосфорамидитные мономеры уридина, 4-N-ацетилцитидина, 6-N-бензоиладенозина и 2-N-изобутирилгуанозина и соответствующие 2'-O-метил- и 2'-фтор-фосфорамидиты в соответствии со стандартными протоколами твердофазного синтеза олигонуклеотидов. Растворы амидитов получают в концентрации 0,1-0,15 М и используют 5-этилтио-1Н-тетразол (0,25-0,6 М в ацетонитриле) в качестве активатора. Фосфортиоатные модификации остова вводят во время синтеза, используя 0,2 М фенилацетила дисульфид (PADS) в лутидине:ацетонитриле (1:1) (об.:об.) или 0,1 М 3-(диметиламинометил)амино-3Н-1,2,4-дитиазол-5-тион (DDTT) в пиридине для стадии окисления. После завершения синтеза, последовательности отщепляют от твердого носителя и снимают защитные группы, используя метиламин, после чего следует триэтиламин.3HF для того, чтобы удалять любые присутствующие защитные 2'-O-т-бутилдиметилсилильные группы.

Для синтеза в масштабе 5-500 мкмоль и полностью 2'-модифицированных последовательностей (2'-фтор- и/или 2'-O-метил- или их сочетания) удаляли защитные группы олигонуклеотидов, используя 3:1 (об./об.) этанол и концентрированный (28-32%) водный аммоний или при 35°C в течение 16 ч или при 55°C в течение 5,5 ч. Перед снятием защитных групп аммонием, олигонуклеотиды обрабатывают 0,5 М пиперидином в ацетонитриле в течение 20 мин

на твердом носителе. Неочищенные олигонуклеотиды анализируют посредством LC-MS и анионообменной ВЭЖХ (IEX-HPLC). Очистку олигонуклеотидов осуществляют посредством анионообменной ВЭЖХ с использованием: 20 мМ фосфата, 10%-15% ACN, pH=8,5 (буфер А) и 20 мМ фосфата, 10%-15% ACN, 1 М NaBr, pH=8,5 (буфер В). Фракции анализируют на чистоту посредством аналитической ВЭЖХ. Содержащие продукт фракции с подходящей чистотой объединяют и концентрируют на роторном испарителе перед обессоливанием. Образцы обессоливают посредством эксклюзионной хроматографии и лиофилизируют досуха. Равные молярные количества смысловых и антисмысловых цепей ренатурируют в 1× буфере PBS для того, чтобы получать соответствующие миРНК дуплексы.

Для малых масштабов (0,2-1 мкмоль), синтез осуществляют на синтезаторе MerMade 192 в 96-луночном формате. В случае полностью 2'-модифицированных последовательностей (2'-фтор и/или 2'-О-метил- или их сочетания) защитные группы с олигонуклеотидов снимают, используя метиламин при комнатной температуре в течение 30-60 мин, после чего следует инкубация при 60°C в течение 30 мин или использование 3:1 (об./об.) этанола и концентрированного (28-32%) водного аммония при комнатной температуре в течение 30-60 мин, после чего следует инкубация при 40°C в течение 1,5 часа. Затем неочищенные олигонуклеотиды осаждают в растворе ацетонитрил: ацетон (9:1) и выделяют посредством центрифугирования и декантирования супернатанта. Осадок неочищенных олигонуклеотидов ресуспендируют в 20 мМ буфере NaOAc и анализируют с помощью LC-MS и анионообменной ВЭЖХ. Неочищенные олигонуклеотидные последовательности обессоливают в планшетах с 96 глубокими лунками на 5 мл колонке HiTrap Sephadex G25 (GE Healthcare). В каждой лунке приблизительно собирают 1,5 мл образцы, соответствующие отдельным последовательностям. Эти очищенные обессоленные олигонуклеотиды анализируют посредством LC-MS и анионообменной хроматографии. Дуплексы получают посредством ренатурирования эквимоллярных количеств смысловых и антисмысловых последовательностей с использованием робота Tecan. Концентрацию дуплексов корректируют до 10 мкМ в 1× буфере PBS.

Синтез GalNAc-конъюгированных олигонуклеотидов для анализа *in vivo*

Олигонуклеотиды, конъюгированные с лигандом GalNAc на их 3'-конце синтезируют в масштабах 0,2-500 мкмоль, используя твердый носитель, предварительно нагруженный Y-образным линкером, несущим защищенную 4,4'-диметокситритилом (DMT) первичную гидроксигруппу для синтеза олигонуклеотида и лиганд GalNAc, прикрепленный через соединитель.

Для синтеза GalNAc-конъюгатов в масштабе 5-500 мкмоль придерживаются приведенного выше протокола синтеза РНК со следующими адаптациями: для полистироловых подложек для синтеза 5% дихлоруксусную кислоту в толуоле используют для DMT-расщепления во время синтеза. Отщепление от подложки и снятие защитных групп осуществляют как описано выше. Богатые фосфортиоатами последовательности (обычно > 5 фосфортиоатов) синтезируют без удаления конечной 5'-DMT группы («DMT-on») и, после отщепления и снятия защитных групп как описано выше, очищают посредством ВЭЖХ с обращенной фазой, используя 50 мМ ацетат аммония в воде (буфер А) и 50 мМ ацетат аммония в 80% ацетонитриле (буфер В). Фракции анализируют на чистоту посредством аналитической ВЭЖХ и/или LC-MS. Содержащие продукт фракции с подходящей чистотой объединяют и концентрируют на роторном испарителе. DMT-группу удаляют с использованием 20%-25% уксусной кислоты в воде до завершения. Образцы обессоливают посредством эксклюзионной хроматографии и лиофилизируют досуха. Равные молярные количества смысловой и антисмысловой цепей ренатурируют в 1× буфере PBS для того, чтобы получать соответствующие миРНК дуплексы.

Для синтеза GalNAc-конъюгатов в малом масштабе (0,2-1 мкмоль), в том числе последовательностей с множеством фосфортиоатных связей, применяют протоколы, описанные выше для синтеза РНК или полностью 2'-F/2'-OMe-содержащих последовательностей на платформе MerMade. Синтез осуществляют на предварительно набитых колонках, содержащих GalNAc-функционализированную стеклянную подложку с контролируемым

размером пор.

Пример 2. Скрининг миРНК дуплексов *in vitro*

Клеточная культура и 96-луночная трансфекция

Клетки Hep3В (АТСС, Manassas, VA) выращивали почти до конфлюэнтности при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в минимальной поддерживающей среде Игла (АТСС) с добавлением 10% FBS, стрептомицина и глутамина (АТСС) до освобождения из планшета посредством трипсинизации. Клетки промывали и ресуспендировали по 0,125×10⁶ клеток/мл. Во время трансфекции клетки высевали в 96-луночный планшет приблизительно по 20000 клеток на лунку.

Трансфекцию осуществляли посредством добавления 14,8 мкл Opti-MEM плюс 0,2 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen™, Carlsbad CA., номер по каталогу 13778-150) в 5 мкл каждого миРНК дуплекса в отдельную лунку в 96-луночном планшете. Затем смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем 80 мкл полной среды для выращивания без антибиотика, содержащей подходящее число клеток, добавляли в смесь миРНК. Клетки инкубировали в течение 24 часов перед РНК очисткой.

Эксперименты с однократной дозой осуществляли при конечной концентрации дуплексов 10 нМ и 0,01 нМ. Эксперименты с эффектом дозы выполняли при конечной концентрации дуплексов 10, 1,67, 0,28, 0,046, 0,0077, 0,0013, 0,00021, 0,000036 нМ.

Клеточная культура и 384-луночная трансфекция

Клетки Hep3В (АТСС, Manassas, VA) выращивали почти до конфлюэнтности при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в минимальной поддерживающей среде Игла (АТСС®) с добавлением 10% FBS, стрептомицина и глутамина (АТСС®) до освобождения из планшета посредством трипсинизации. Клетки промывали и ресуспендировали при концентрации 0,125×10⁶ клеток/мл. Во время трансфекции клетки высевали на 384-луночный планшет приблизительно по 5000 клеток на лунку.

Трансфекцию осуществляли посредством добавления 4,9 мкл Opti-MEM плюс 0,1 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen™, Carlsbad CA., номер по каталогу 13778-150) к 5 мкл

каждого миРНК дуплекса в отдельную лунку в 96-луночном планшете. Затем смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем 40 мкл полной среды для выращивания без антибиотика, содержащей подходящее число клеток, добавляли в смесь миРНК. Клетки инкубировали в течение 24 часов перед РНК очисткой.

Эксперименты с однократной дозой осуществляли при конечной концентрации дуплексов 10 нМ и 0,01 нМ. Эксперименты с эффектом дозы осуществляли при конечной концентрации дуплексов 10, 1,67, 0,28, 0,046, 0,0077, 0,0013, 0,00021, 0,000036 нМ.

Выделение общей РНК с использованием DYNABEADS mRNA Isolation Kit (Invitrogen™, № изделия 610-12) -96-луночное выделение

Клетки собирали и лизировали в 150 мкл Lysis/Binding Buffer, затем перемешивали в течение 5 минут на 850 об./мин, используя Eppendorf Thermomixer (скорость перемешивания была одинаковой на всем протяжении процесса). Смесь из 10 мкл магнитных бус и 80 мкл Lysis/Binding Buffer добавляли в круглодонный планшет и перемешивали в течение 1 минуты. Магнитные бусы захватывали с использованием магнитного штатива и супернатант удаляли, не затрагивая бусы. После удаления супернатанта, лизированные клетки добавляли к оставшимся бусам и смешивали в течение 5 минут. После удаления супернатанта, магнитные бусы промывали 2 раза в 150 мкл буфера для промывания А и перемешивали в течение 1 минуты. Бусы снова захватывали и удаляли супернатант. Затем бусы промывали в 150 мкл буфера для промывания В, захватывали, а супернатант удаляли. После этого бусы промывали в 150 мкл элюирующего буфера, захватывали, а супернатант удаляли. Бусы оставляли сохнуть в течение 2 минут. После сушки добавляли 50 мкл элюирующего буфера и перемешивали в течение 5 минут при 70°C. Бусы захватывали магнитом в течение 5 минут. 40 мкл супернатанта удаляли и добавляли в другой 96-луночный планшет.

Синтез кДНК с использованием ABI High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, № по

каталогу 4368813)

Мастер-микс из 2 мкл 10× буфера, 0,8 мкл 25× dNTP, 2 мкл случайных праймеров, 1 мкл обратной транскриптазы, 1 мкл ингибитора РНКазы и 3,2 мкл H₂O на реакцию добавляли к 10 мкл общей РНК. кДНК получали, используя Bio-Rad C-1000 или S-1000 (Hercules, CA) и следующие стадии: 25°C 10 мин, 37°C 120 мин, 85°C 5 с, удержание на 4°C.

Выделение общей РНК с использованием DYNABEADS mRNA Isolation Kit (Invitrogen™, № изделия 610-12) - 384-луночное экстрагирование

Клетки лизировали в 50 мкл Lysis/Binding Buffer. Magnetic Dynabeads промывали в Lysis/Binding Buffer и ресуспендировали в нем же. Затем добавляли 25 мкл Lysis/Binding Buffer, содержащего 2 мкл Dynabeads, на лунку. После встряхивания планшетов в течение 10 минут на «7» на Vibratranslator (UnionScientific), использовали автоматизированную систему промывания планшетов (Biotek EL406 с Biostacker и планшетом для магнитного захвата). Затем планшеты промывали подобно тому, что описано для 96-луночного процесса: два раза буфером А (90 мкл), один раз буфером В (90 мкл) и два раза буфером С (100 мкл). Последний смыв удаляли из планшета и незамедлительно начинали кДНК синтез.

Синтез кДНК с использованием ABI High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, № по каталогу 4368813) -384-луночный синтез

Мастер-микс из 2 мкл 10× буфера, 0,8 мкл 25× dNTP, 2 мкл случайных праймеров, 1 мкл обратной транскриптазы, 1 мкл ингибитора РНКазы и 13,2 мкл H₂O на реакцию добавляли в лунки 384-луночного планшета, содержащего только экстрагированную РНК и магнитные бусы (общий объем 20 мкл). кДНК получали посредством инкубации при 25°C в течение 10 мин, 37°C в течение 120 мин и 85°C в течение 8 минут.

ПЦР в реальном времени:

2 мкл кДНК добавляли в мастер-микс, содержащий 0,5 мкл зонда GAPDH TaqMan человека (Applied Biosystems, № по каталогу 4326317E) и 0,5 мкл зонда AGT TaqMan человека (Applied

Biosystems, № по каталогу Hs00174854m1), 2 мкл безнуклеазной воды и 5 мкл мастер-микса зондов Lightcycler 480 (Roche, № по каталогу 04887301001) на лунку в 384-луночных планшетах (Roche, № по каталогу 04887301001). qPCR осуществляли в приборе для ПЦР в реальном времени LightCycler 480 (Roche). Для того чтобы вычислять относительную кратность изменения, данные анализировали с использованием способа $\Delta\Delta C_t$ и нормализовали по анализам, которые выполняли для клеток, трансфицированных 10 нМ AD-1955, или клеток, трансфицированных имитатором. IC₅₀ вычисляли с использованием четырехпараметрической модели аппроксимации, используя XLFit, и осуществляли нормализацию по клеткам, трансфицированным AD-1955 или трансфицированным имитатором.

Смысловые и антисмысловые последовательности AD-1955:

СМЫСЛОВАЯ: cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT (SEQ ID № 13)

АНТИСМЫСЛОВАЯ: UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT (SEQ ID № 14).

В таблице 5 представлены результаты скрининга однократных доз в клетках Нер3В, трансфицированных с использованием 96-луночного способа и указанных 19-членных иРНК АГТ. Данные представлены в процентах остающейся мРНК относительно необработанных клеток.

В таблице 6 представлен эффект дозы для клеток Нер3В, трансфицированных с использованием 96-луночного способа и указанных 19-членных иРНК АГТ. Приведенные значения IC₅₀ представляют значения IC₅₀ относительно необработанных клеток.

В таблице 9 представлены результаты скрининга однократных доз на клетках Нер3В, трансфицированных с использованием 384-луночного способа и указанных 21/23-членных конъюгированных иРНК АГТ. Данные представлены в процентах остающейся мРНК относительно необработанных клеток.

В таблице 10 представлен эффект дозы клеток Нер3В, трансфицированных с использованием 384-луночного способа и указанных 21/23-членных конъюгированных иРНК АГТ. Приведенные значения IC₅₀ представляют значения IC₅₀ относительно необработанных клеток.

В таблице 12 представлены результаты скрининга однократных доз в клетках Нер3В, трансфицированных с использованием 96-луночного способа и указанных 19-членных иРНК АГТ. Данные представлены в процентах остающейся мРНК относительно необработанных клеток.

В таблице 14 представлены результаты дозозависимого скрининга однократных доз для нокдауна hAGT с использованием указанных 21/23-членных конъюгированных иРНК АГТ у мышей, инфицированных AAV вектором, экспрессирующим hAGT.

В таблице 16 представлены результаты дозозависимого скрининга однократных доз для нокдауна hAGT с использованием указанных 21/23-членных конъюгатов иРНК АГТ у мышей, инфицированных AAV вектором, экспрессирующим hAGT.

Таблица 2. Сокращения для нуклеотидных мономеров, используемые в представлении последовательности нуклеиновой кислоты. Понятно, что эти мономеры, когда присутствуют в олигонуклеотиде, связаны друг с другом с помощью 5'-3'-фосфодиэфирных связей.

Сокращение	Нуклеотид (нуклеотиды)
A	Аденозин-3'-фосфат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-фтораденозин-3'-фосфортиоат
As	Аденозин-3'-фосфортиоат
C	Цитидин-3'-фосфат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфортиоат
Cs	Цитидин-3'-фосфортиоат
G	Гуанозин-3'-фосфат
Gf	2'-фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-фторгуанозин-3'-фосфортиоат
Gs	Гуанозин-3'-фосфортиоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат

Tfs	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфортиоат
Ts	5-метилуридин-3'-фосфортиоат
U	Уридин-3'-фосфат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин -3'-фосфортиоат
Us	Уридин-3'-фосфортиоат
N	Любой нуклеотид (G, A, C, T или U)
a	2'-O-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-O-метиладенозин-3'-фосфортиоат
c	2'-O-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-O-метилцитидин-3'-фосфортиоат
g	2'-O-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-O-метилгуанозин-3'-фосфортиоат
t	2'-O-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-O-метил-5-метилуридин-3'-фосфортиоат
u	2'-O-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-O-метилуридин-3'-фосфортиоат
s	Фосфортиоатная связь
L96	N- [трис (GalNAc-алкил) -амидодеканойл] -4- гидроксипролинол Нур- (GalNAc-алкил) 3
(dt) или dT	Дезокситимин
dC	2'-дезоксцитидин-3'-фосфат
Y44	Инвертированная абазическая ДНК (2- гидроксиметил-тетрагидрофуран-5-фосфат)
(Tgn)	S-изомер тимидин-гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
P	Фосфат
VP	Винилфосфат
(Aam)	2'-O- (N-метилацетамид) аденозин-3'-фосфат
(Aams)	2'-O- (N-метилацетамид) аденозин-3'-фосфортиоат
(Tgn)	S-изомер тимидин-гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)

(Cgn)	Цитидин-гликолевая нуклеиновая кислота (GNA)
-------	--

Таблица 3. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей дцРНК АГТ (19-членные олигомеры)

Название дуплекса	Положение относительно NM_000029.3	Название смысловой	Смысловая последовательность	SEQ ID №	Название антисмысловой	Положение относительно NM_000029.3	Антисмысловая последовательность	SEQ ID №
UM AD-56041.1	485-503	A-115161.1	UUCUGGGUACUACAG CAGA	15	A-115162.1	485-503	UCUGCUGUAGUACCC AGAA	131
UM AD-52431.1	491-509	A-107992.1	GUACUACAGCAGAAG GGUA	16	A-107993.1	491-509	UACCCUUCUGCUGUA GUAC	132
UM AD-56057.1	606-624	A-115229.1	GUGACCGGGUGUACA UACA	17	A-115230.1	606-624	UGUAUGUACACCCGG UCAC	133
UM AD-56047.1	635-653	A-115163.1	CUCGUCAUCCACAAU GAGA	18	A-115164.1	635-653	UCUCAUUGUGGAUGA CGAG	134
UM AD-52437.1	643-661	A-107994.1	CCACAAUGAGAGUAC CUGU	19	A-107995.1	643-661	ACAGGUACUCUCAUU GUGG	135
UM AD-56064.1	644-662	A-115247.1	CACAAUGAGAGUACC UGUG	20	A-115248.1	644-662	CACAGGUACUCUCAU UGUG	136
UM AD-56021.1	658-676	A-115123.1	CUGUGAGCAGCUGGC AAAG	21	A-115124.1	658-676	CUUUGCCAGCUGCUC ACAG	137
UM AD-56067.1	741-759	A-115201.1	CUGUGGAUGAAAAGG CCCU	22	A-115202.1	741-759	AGGGCCUUUCAUCC ACAG	138
UM AD-56030.1	822-840	A-115173.1	UGGUCGGGAUGCUGG CCAA	23	A-115174.1	822-840	UUGGCCAGCAUCCCG ACCA	139
UM AD-56034.1	825-843	A-115237.1	UCGGGAUGCUGGCCA ACUU	24	A-115238.1	825-843	AAGUUGGCCAGCAUC CCGA	140
UM AD-828-846	828-846	A-107996.1	GGAUGCUGGCCAACU	25	A-107997.1	828-846	AAGAAGUUGGCCAGC	141

52443.1			UCUU				AUCC	
UM AD- 56017.1	834-852	A-115153.1	UGGCCAACUUCUUGG GCUU	26	A-115154.1	834-852	AAGCCCAAGAAGUUG GCCA	142
UM AD- 52449.1	841-859	A-107998.1	CUUCUUGGGCUUCCG UAUA	27	A-107999.1	841-859	UAUACGGAAGCCCAA GAAG	143
UM AD- 52455.1	844-862	A-108000.1	CUUGGGCUUCCGUU AUUAU	28	A-108001.1	844-862	AUAUAUACGGAAGCC CAAG	144
UM AD- 52461.1	849-867	A-108002.1	GCUUCCGUUAUAUAG GCAU	29	A-108003.1	849-867	AUGCCAUUAUACGG AAGC	145
UM AD- 56025.1	855-873	A-115187.1	GUAUAUAUGGCAUGC ACAG	30	A-115188.1	855-873	CUGUGCAUGCCAUU AUAC	146
UM AD- 52467.1	863-881	A-108004.1	GGCAUGCACAGUGAG CUAU	31	A-108005.1	863-881	AUAGCUCACUGUGCA UGCC	147
UM AD- 56061.1	878-896	A-115199.1	CUAUGGGGCGUGGUC CAUG	32	A-115200.1	878-896	CAUGGACCACGCCCC AUAG	148
UM AD- 52473.1	910-928	A-108006.1	CUCCCCAACGGCUGU CUUU	33	A-108007.1	910-928	AAAGACAGCCGUUG GGAG	149
UM AD- 56063.1	911-929	A-115231.1	UCCCCAACGGCUGUC UUUG	34	A-115232.1	911-929	CAAAGACAGCCGUUG GGGA	150
UM AD- 56046.1	1002-1020	A-115241.1	CUUGGAAGGACAAGA ACUG	35	A-115242.1	1002-1020	CAGUUCUUGUCCUUC CAAG	151
UM AD- 52432.1	1214-1232	A-108008.1	CCACGCUCUCUGGAC UUCA	36	A-108009.1	1214-1232	UGAAGUCCAGAGAGC GUGG	152
UM AD- 52438.1	1247-1265	A-108010.1	GCUGCUGAGAAGAUU GACA	37	A-108011.1	1247-1265	UGUCAUUCUUCUCAG CAGC	153
UM AD- 56059.1	1248-1266	A-115167.1	CUGCUGAGAAGAUUG ACAG	38	A-115168.1	1248-1266	CUGUCAUUCUUCUCA GCAG	154

UM 56016.1	AD-	1249-1267	A-115137.1	UGCUGAGAAGAUUGA CAGG	39	A-115138.1	1249-1267	CCUGUCAAUUCUUCUC AGCA	155
UM 56068.1	AD-	1250-1268	A-115217.1	GCUGAGAAGAUUGAC AGGU	40	A-115218.1	1250-1268	ACCUGUCAAUUCUUCU CAGC	156
UM 55989.1	AD-	1251-1269	A-115081.1	CUGAGAAGAUUGACA GGUU	41	A-115082.1	1251-1269	AACCUGUCAAUUCUUC UCAG	157
UM 56040.1	AD-	1260-1278	A-115239.1	UUGACAGGUUCAUGC AGGC	42	A-115240.1	1260-1278	GCCUGCAUGAACCUG UCAA	158
UM 56069.1	AD-	1277-1295	A-115233.1	GCUGUGACAGGAUGG AAGA	43	A-115234.1	1277-1295	UCUCCAUCUGUCA CAGC	159
UM 52444.1	AD-	1403-1421	A-108012.1	GAGUUCUGGGUGGAC AACA	44	A-108013.1	1403-1421	UGUUGUCCACCCAGA ACUC	160
UM 56033.1	AD-	1408-1426	A-115221.1	CUGGGUGGACAACAG CACC	45	A-115222.1	1408-1426	GGUGCUGUUGUCCAC CCAG	161
UM 56058.1	AD-	1413-1431	A-115245.1	UGGACAACAGCACCU CAGU	46	A-115246.1	1413-1431	ACUGAGGUGCUGUUG UCCA	162
UM 52450.1	AD-	1417-1435	A-108014.1	CAACAGCACCUUCAGU GUCU	47	A-108015.1	1417-1435	AGACACUGAGGUGCU GUUG	163
UM 55981.1	AD-	1566-1584	A-115141.1	UGGACAAGGUGGAGG GUCU	48	A-115142.1	1566-1584	AGACCCUCCACCUUG UCCA	164
UM 56032.1	AD-	1570-1588	A-115205.1	CAAGGUGGAGGGUCU CACU	49	A-115206.1	1570-1588	AGUGAGACCCUCCAC CUUG	165
UM 56066.1	AD-	1572-1590	A-115185.1	AGGUGGAGGGUCUCA CUUU	50	A-115186.1	1572-1590	AAAGUGAGACCCUCC ACCU	166
UM 52456.1	AD-	1587-1605	A-108016.1	CUUUCAGCAAAACU CCCU	51	A-108017.1	1587-1605	AGGGAGUUUUGCUGG AAAG	167
UM	AD-	1591-1609	A-115181.1	CCAGCAAAACUCCCU	52	A-115182.1	1591-1609	GUUGAGGGAGUUUUG	168

56054.1			CAAC				CUGG	
UM AD- 56035.1	1592-1610	A-115159.1	CAGCAAAACUCCUC AACU	53	A-115160.1	1592-1610	AGUUGAGGGAGUUUU GCUG	169
UM AD- 52462.1	1595-1613	A-108018.1	CAAAACUCCUCAAC UGGA	54	A-108019.1	1595-1613	UCCAGUUGAGGGAGU UUUG	170
UM AD- 56026.1	1601-1619	A-115203.1	UCCCUCAACUGGAUG AAGA	55	A-115204.1	1601-1619	UCUUCAUCCAGUUGA GGGA	171
UM AD- 56022.1	1602-1620	A-115139.1	CCCUCAACUGGAUGA AGAA	56	A-115140.1	1602-1620	UUCUUCAUCCAGUUG AGGG	172
UM AD- 55983.1	1605-1623	A-115079.1	UCAACUGGAUGAAGA AACU	57	A-115080.1	1605-1623	AGUUUCUUCAUCCAG UUGA	173
UM AD- 56028.1	1728-1746	A-115235.1	CCGAGCUGAACCUGC AAAA	58	A-115236.1	1728-1746	UUUUGCAGGUUCAGC UCGG	174
UM AD- 55980.1	1729-1747	A-115125.1	CGAGCUGAACCUGCA AAAA	59	A-115126.1	1729-1747	UUUUUGCAGGUUCAG CUCG	175
UM AD- 56036.1	1735-1753	A-115175.1	GAACCUGCAAAAAUU GAGC	60	A-115176.1	1735-1753	GCUCAAUUUUUGCAG GUUC	176
UM AD- 56014.1	1737-1755	A-115105.1	ACCUGCAAAAAUUGA GCAA	61	A-115106.1	1737-1755	UUGCUCAAUUUUUGC AGGU	177
UM AD- 56007.1	1738-1756	A-115087.1	CCUGCAAAAAUUGAG CAAU	62	A-115088.1	1738-1756	AUUGCUCAAUUUUUG CAGG	178
UM AD- 56012.1	1739-1757	A-115073.1	CUGCAAAAAUUGAGC AAUG	63	A-115074.1	1739-1757	CAUUGCUCAAUUUUU GCAG	179
UM AD- 56055.1	1740-1758	A-115197.1	UGCAAAAAUUGAGCA AUGA	64	A-115198.1	1740-1758	UCAUUGCUCAAUUUU UGCA	180
UM AD- 56029.1	1741-1759	A-115157.1	GCAAAAAUUGAGCAA UGAC	65	A-115158.1	1741-1759	GUCAUUGCUCAAUUU UUGC	181

UM 52469.1	AD-	1767-1785	A-108036.1	GGGUGGGGGAGGUGC UGAA	66	A-108037.1	1767-1785	UUCAGCACCUCCCC ACCC	182
UM 56053.1	AD-	1810-1828	A-115165.1	GGAUGAGAGAGAGCC CACA	67	A-115166.1	1810-1828	UGUGGGCUCUCUCUC AUCC	183
UM 52468.1	AD-	1879-1897	A-108020.1	CCGCCCAUUCUGUU UGCU	68	A-108021.1	1879-1897	AGCAAACAGGAAUGG GCGG	184
UM 56045.1	AD-	1885-1903	A-115225.1	AUUCUGUUUGCUGU GUAU	69	A-115226.1	1885-1903	AUACACAGCAAACAG GAU	185
UM 56056.1	AD-	1887-1905	A-115213.1	UCCUGUUUGCUGUGU AUGA	70	A-115214.1	1887-1905	UCAUACACAGCAAAC AGGA	186
UM 56010.1	AD-	1891-1909	A-115135.1	GUUUGCUGUGUAUGA UCAA	71	A-115136.1	1891-1909	UUGAUCAUACACAGC AAAC	187
UM 56015.1	AD-	1892-1910	A-115121.1	UUUGCUGUGUAUGAU CAAA	72	A-115122.1	1892-1910	UUUGAUCAUACACAG CAAA	188
UM 56039.1	AD-	2070-2088	A-115223.1	CCCCAGUCUCCAC CUUU	73	A-115224.1	2070-2088	AAAGGUGGGAGACUG GGGG	189
UM 55991.1	AD-	2080-2098	A-115113.1	CCCACCUUUUCUUCU AAUG	74	A-115114.1	2080-2098	CAUUAGAAGAAAAGG UGGG	190
UM 52474.1	AD-	2081-2099	A-108022.1	CCACCUUUUCUUCUA AUGA	75	A-108023.1	2081-2099	UCAUUAGAAGAAAAG GUGG	191
UM 56024.1	AD-	2082-2100	A-115171.1	CACCUUUUCUUCUAA UGAG	76	A-115172.1	2082-2100	CUCAUUAGAAGAAAA GGUG	192
UM 52433.1	AD-	2125-2143	A-108024.1	GUUUCUCCUUGGUCU AAGU	77	A-108025.1	2125-2143	ACUUAGACCAAGGAG AAAC	193
UM 56037.1	AD-	2199-2217	A-115191.1	UUGCUGGGUUUAUUU UAGA	78	A-115192.1	2199-2217	UCUAAAAUAAACCCA GCAA	194
UM	AD-	2200-2218	A-115195.1	UGCUGGGUUUAUUUU	79	A-115196.1	2200-2218	CUCUAAAAUAAACCC	195

56049.1			AGAG				AGCA	
UM AD- 52439.1	2201-2219	A-108026.1	GCUGGGUUUAUUUA GAGA	80	A-108027.1	2201-2219	UCUCUAAAAUAAACC CAGC	196
UM AD- 55978.1	2202-2220	A-115093.1	CUGGGUUUAUUUAG AGAA	81	A-115094.1	2202-2220	UUCUCUAAAAUAAAC CCAG	197
UM AD- 55999.1	2203-2221	A-115147.1	UGGGUUUAUUUAGA GAAU	82	A-115148.1	2203-2221	AUUCUCUAAAAUAAA CCCA	198
UM AD- 56050.1	2206-2224	A-115211.1	GUUUUUUUAGAGAA UGGG	83	A-115212.1	2206-2224	CCCAUUCUCUAAAAU AAAC	199
UM AD- 56031.1	2209-2227	A-115189.1	UAUUUUAGAGAAUGG GGGU	84	A-115190.1	2209-2227	ACCCCAUUCUCUAA AAUA	200
UM AD- 56027.1	2227-2245	A-115219.1	UGGGGAGGCAAGAAC CAGU	85	A-115220.1	2227-2245	ACUGGUUCUUGCCUC CCCA	201
UM AD- 55987.1	2230-2248	A-115143.1	GGAGGCAAGAACCAG UGUU	86	A-115144.1	2230-2248	AACACUGGUUCUUGC CUCC	202
UM AD- 56043.1	2266-2284	A-115193.1	UCCAAAAAGAAUCC AACC	87	A-115194.1	2266-2284	GGUUGGAAUUCUUUU UGGA	203
UM AD- 56001.1	2268-2286	A-115085.1	CAAAAAGAAUCCAA CCGA	88	A-115086.1	2268-2286	UCGGUUGGAAUUCUU UUUG	204
UM AD- 52445.1	2279-2297	A-108028.1	CCAACCGACCAGCUU GUUU	89	A-108029.1	2279-2297	AAACAAGCUGGUCGG UUGG	205
UM AD- 52451.1	2283-2301	A-108030.1	CCGACCAGCUUGUUU GUGA	90	A-108031.1	2283-2301	UCACAAACAAGCUGG UCGG	206
UM AD- 52457.1	2284-2302	A-108032.1	CGACCAGCUUGUUUG UGAA	91	A-108033.1	2284-2302	UUCACAAACAAGCUG GUCG	207
UM AD- 52463.1	2285-2303	A-108034.1	GACCAGCUUGUUUGU GAAA	92	A-108035.1	2285-2303	UUUCACAAACAAGCU GGUC	208

UM 55982.1	AD-	2290-2308	A-115063.1	GCUUGUUUGUGAAAC AAAA	93	A-115064.1	2290-2308	UUUUGUUUCACAAAC AAGC	209
UM 56019.1	AD-	2291-2309	A-115091.1	CUUGUUUGUGAAACA AAAA	94	A-115092.1	2291-2309	UUUUUGUUUCACAAA CAAG	210
UM 55988.1	AD-	2292-2310	A-115065.1	UUGUUUGUGAAACAA AAAA	95	A-115066.1	2292-2310	UUUUUUGUUUCACAA ACAA	211
UM 55994.1	AD-	2294-2312	A-115067.1	GUUUGUGAAACAAAA AAGU	96	A-115068.1	2294-2312	ACUUUUUUGUUUCAC AAAC	212
UM 56013.1	AD-	2296-2314	A-115089.1	UUGUGAAACAAAAAA GUGU	97	A-115090.1	2296-2314	ACACUUUUUUGUUUC ACAA	213
UM 56065.1	AD-	2299-2317	A-115169.1	UGAAACAAAAAAGUG UUCC	98	A-115170.1	2299-2317	GGAACACUUUUUUGU UUCA	214
UM 56008.1	AD-	2304-2322	A-115103.1	CAAAAAAGUGUCCCU UUUU	99	A-115104.1	2304-2322	AAAAGGGAACACUUU UUUG	215
UM 56048.1	AD-	2306-2324	A-115179.1	AAAAAGUGUCCCUU UUCA	100	A-115180.1	2306-2324	UGAAAAGGGAACACU UUUU	216
UM 56003.1	AD-	2307-2325	A-115117.1	AAAAGUGUCCCUUU UCA	101	A-115118.1	2307-2325	UUGAAAAGGGAACAC UUUU	217
UM 56051.1	AD-	2314-2332	A-115227.1	UUCUUUUUCAAGUU GAGA	102	A-115228.1	2314-2332	UCUCAACUUGAAAAG GGAA	218
UM 56044.1	AD-	2317-2335	A-115209.1	CCUUUUCAGUUGAG AACA	103	A-115210.1	2317-2335	UGUUCUCAACUUGAA AAGG	219
UM 55996.1	AD-	2320-2338	A-115099.1	UUUCAAGUUGAGAAC AAAA	104	A-115100.1	2320-2338	UUUUGUUCUCAACUU GAAA	220
UM 56002.1	AD-	2321-2339	A-115101.1	UUCAAGUUGAGAACA AAAA	105	A-115102.1	2321-2339	UUUUUGUUCUCAACU UGAA	221
UM	AD-	2323-2341	A-115061.1	CAAGUUGAGAACAAA	106	A-115062.1	2323-2341	AAUUUUUGUUCUCA	222

55976.1			AAUU				CUUG	
UM AD- 56062.1	2325-2343	A-115215.1	AGUUGAGAACAAAAA UUGG	107	A-115216.1	2325-2343	CCAAUUUUUGUUCUC AACU	223
UM AD- 56011.1	2326-2344	A-115151.1	GUUGAGAACAAAAAU UGGG	108	A-115152.1	2326-2344	CCCAAUUUUUGUUCU CAAC	224
UM AD- 56009.1	2328-2346	A-115119.1	UGAGAACAAAAAUUG GGUU	109	A-115120.1	2328-2346	AACCCAAUUUUUGUU CUCA	225
UM AD- 56020.1	2329-2347	A-115107.1	GAGAACAAAAAUUGG GUUU	110	A-115108.1	2329-2347	AAACCCAAUUUUUGU UCUC	226
UM AD- 55979.1	2331-2349	A-115109.1	GAACAAAAAUUGGGU UUUA	111	A-115110.1	2331-2349	UAAAACCCAAUUUUU GUUC	227
UM AD- 55997.1	2332-2350	A-115115.1	AACAAAAAUUGGGUU UUAA	112	A-115116.1	2332-2350	UUAAAACCCAAUUUU UGUU	228
UM AD- 56000.1	2333-2351	A-115069.1	ACAAAAAUUGGGUUU UAAA	113	A-115070.1	2333-2351	UUUAAAACCCAAUUU UUGU	229
UM AD- 56006.1	2334-2352	A-115071.1	CAAAAAUUGGGUUUU AAAA	114	A-115072.1	2334-2352	UUUUAAAACCCAAUU UUUG	230
UM AD- 55990.1	2339-2357	A-115097.1	AUUGGGUUUUAAAAU UAAA	115	A-115098.1	2339-2357	UUUAAUUUUAAAACC CAAU	231
UM AD- 55984.1	2340-2358	A-115095.1	UUGGGUUUUAAAAUU AAAG	116	A-115096.1	2340-2358	CUUUAAUUUUAAAAC CCAA	232
UM AD- 55995.1	2341-2359	A-115083.1	UGGGUUUUAAAAUUA AAGU	117	A-115084.1	2341-2359	ACUUUAAUUUUAAAA CCCA	233
UM AD- 56004.1	2346-2364	A-115133.1	UUUAAAAUUAAAGUA UACA	118	A-115134.1	2346-2364	UGUAUACUUUAAUUU UAAA	234
UM AD- 56042.1	2347-2365	A-115177.1	UUAAAAUUAAAGUAU ACAU	119	A-115178.1	2347-2365	AUGUAUACUUUAAUU UUAA	235

UM 55992.1	AD-	2384-2402	A-115129.1	UUGUAUUUAGUGUCU UGAA	120	A-115130.1	2384-2402	UUCAAGACACUAAA ACAA	236
UM 55977.1	AD-	2385-2403	A-115077.1	UGUAUUUAGUGUCUU GAAU	121	A-115078.1	2385-2403	AUUCAAGACACUAAA UACA	237
UM 56005.1	AD-	2391-2409	A-115149.1	UAGUGUCUUGAAUGU AAGA	122	A-115150.1	2391-2409	UCUUACAUUCAAGAC ACUA	238
UM 56052.1	AD-	2397-2415	A-115243.1	CUUGAAUGUAAGAAC AUGA	123	A-115244.1	2397-2415	UCAUGUUCUUACAUU CAAG	239
UM 55985.1	AD-	2398-2416	A-115111.1	UUGAAUGUAAGAACA UGAC	124	A-115112.1	2398-2416	GUCAUGUUCUUACAU UCAA	240
UM 56038.1	AD-	2439-2457	A-115207.1	CUUAGUUUUUCCAC AGAU	125	A-115208.1	2439-2457	AUCUGUGAAAAAAC UAAG	241
UM 56023.1	AD-	2450-2468	A-115155.1	CCACAGAUGCUUGUG AUUU	126	A-115156.1	2450-2468	AAAUCACAAGCAUCU GUGG	242
UM 56018.1	AD-	2452-2470	A-115075.1	ACAGAUGCUUGUGAU UUUU	127	A-115076.1	2452-2470	AAAAUCACAAGCAU CUGU	243
UM 56060.1	AD-	2497-2515	A-115183.1	CUGAAUUUCUGUUUG AAUG	128	A-115184.1	2497-2515	CAUUCAAACAGAAU UCAG	244
UM 55993.1	AD-	2519-2537	A-115145.1	AACCAUAGCUGGUUA UUUC	129	A-115146.1	2519-2537	GAAUAACCAGCUAU GGUU	245
UM 55986.1	AD-	2521-2539	A-115127.1	CCAUAGCUGGUUAU UCUC	130	A-115128.1	2521-2539	GAGAAUAACCAGCU AUGG	246

Таблица 4. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей дцРНК AGT (19-членные олигомеры)

Название дуплекса	Название смысловой	Смысловая последовательность	SEQ ID №	Название антисмысловой	Антисмысловая последовательность	SEQ ID №
AD-56041.1	A-115161.1	uucuGGGuAcuAcAGcAGAdTsdT	247	A-115162.1	UCUGCUGuAGuACCcAGAAAdTsdT	363

AD-52431.1	A-107992.1	GuAcuAcAGcAGAAGGGuAdTsdT	248	A-107993.1	uACCCUUCUGCUGuAGuACdTsdt	364
AD-56057.1	A-115229.1	GuGAccGGGuGuAcAuAcAdTsdT	249	A-115230.1	UGuAUGuAcACCCGGUcACdTsdt	365
AD-56047.1	A-115163.1	cucGucAuccAcAAuGAGAdTsdT	250	A-115164.1	UCUcAUUGUGGAUGACGAGdTsdt	366
AD-52437.1	A-107994.1	ccAcAAuGAGAGuAccuGudTsdT	251	A-107995.1	AcAGGuACUCUcAUUGUGGdTsdt	367
AD-56064.1	A-115247.1	cAcAAuGAGAGuAccuGuGdTsdt	252	A-115248.1	cAcAGGuACUCUcAUUGUGdTsdt	368
AD-56021.1	A-115123.1	cuGuGAGcAGcuGGcAAAGdTsdt	253	A-115124.1	CUUUGCcAGCUGCUcAcAGdTsdt	369
AD-56067.1	A-115201.1	cuGuGGAuGAAAAGGcccudTsdt	254	A-115202.1	AGGGCCUUUcAUCcAcAGdTsdt	370
AD-56030.1	A-115173.1	uGGucGGGAuGcuGGccAAAdTsdt	255	A-115174.1	UUGGCcAGcAUCCCGACcAdTsdt	371
AD-56034.1	A-115237.1	ucGGGAuGcuGGccAAcuudTsdt	256	A-115238.1	AAGUUGGCcAGcAUCCGAdTsdt	372
AD-52443.1	A-107996.1	GGAuGcuGGccAAcuucuudTsdt	257	A-107997.1	AAGAAGUUGGCcAGcAUCCdTsdt	373
AD-56017.1	A-115153.1	uGGccAAcuucuGGGcuudTsdt	258	A-115154.1	AAGCCcAAGAAGUUGGCcAdTsdt	374
AD-52449.1	A-107998.1	cuucuGGGcuuccGuAuAdTsdt	259	A-107999.1	uAuACGGAAGCCcAAGAAGdTsdt	375
AD-52455.1	A-108000.1	cuuGGGcuuccGuAuAuAdTsdt	260	A-108001.1	AuAuAuACGGAAGCCcAAGdTsdt	376
AD-52461.1	A-108002.1	GcuuccGuAuAuAuGGcAdTsdt	261	A-108003.1	AUGCcAuAuAuACGGAAGCdTsdt	377
AD-56025.1	A-115187.1	GuAuAuAuGGcAuGcAcAGdTsdt	262	A-115188.1	CUGUGcAUGCcAuAuAuACdTsdt	378
AD-52467.1	A-108004.1	GGcAuGcAcAGuGAGcuAdTsdt	263	A-108005.1	AuAGCUcACUGUGcAUGCCdTsdt	379
AD-56061.1	A-115199.1	cuAuGGGGcGuGGuccAuGdTsdt	264	A-115200.1	cAUGGACcACGCCcAuAGdTsdt	380
AD-52473.1	A-108006.1	cuccccAAcGGcuGucuudTsdt	265	A-108007.1	AAAGAcAGCCGUUGGGGAGdTsdt	381
AD-56063.1	A-115231.1	uccccAAcGGcuGucuudTsdt	266	A-115232.1	cAAAGAcAGCCGUUGGGGAdTsdt	382
AD-56046.1	A-115241.1	cuuGGAAGGAcAAGAAcuGdTsdt	267	A-115242.1	cAGUUCUUGUCCUUCcAAGdTsdt	383
AD-52432.1	A-108008.1	ccAcGcucucuGGAcuucAdTsdt	268	A-108009.1	UGAAGUCcAGAGAGCGUGGdTsdt	384
AD-52438.1	A-108010.1	GcuGcuGAGAAGAuGAcAdTsdt	269	A-108011.1	UGUcAAUCUUCUcAGcAGCdTsdt	385
AD-56059.1	A-115167.1	cuGcuGAGAAGAuGAcAGdTsdt	270	A-115168.1	CUGUcAAUCUUCUcAGcAGdTsdt	386
AD-56016.1	A-115137.1	uGcuGAGAAGAuGAcAGGdTsdt	271	A-115138.1	CCUGUcAAUCUUCUcAGcAdTsdt	387
AD-56068.1	A-115217.1	GcuGAGAAGAuGAcAGGudTsdt	272	A-115218.1	ACCUGUcAAUCUUCUcAGCdTsdt	388
AD-55989.1	A-115081.1	cuGAGAAGAuGAcAGGuudTsdt	273	A-115082.1	AACCUGUcAAUCUUCUcAGdTsdt	389
AD-56040.1	A-115239.1	uuGAcAGGuucAuGcAGGcdTsdt	274	A-115240.1	GCCUGcAUGAACCGUcAAAdTsdt	390

AD-56069.1	A-115233.1	GcuGuGAcAGGAuGGAAGAdTsdT	275	A-115234.1	UCUUCcAUCCUGUcAcAGCdTsdT	391
AD-52444.1	A-108012.1	GAGuucuGGGuGGAcAAcAdTsdT	276	A-108013.1	UGUUGUCcACCcAGAACUCdTsdT	392
AD-56033.1	A-115221.1	cuGGGuGGAcAAcAGcAccdTsdT	277	A-115222.1	GGUGCUGUUGUCcACCcAGdTsdT	393
AD-56058.1	A-115245.1	uGGAcAAcAGcAccucAGudTsdT	278	A-115246.1	ACUGAGGUGCUGUUGUCcAdTsdT	394
AD-52450.1	A-108014.1	cAAcAGcAccucAGuGucudTsdT	279	A-108015.1	AGAcACUGAGGUGCUGUUGdTsdT	395
AD-55981.1	A-115141.1	uGGAcAAGGuGGAGGGucudTsdT	280	A-115142.1	AGACCCUCcACCUUGUCcAdTsdT	396
AD-56032.1	A-115205.1	cAAGGuGGAGGGucucAcudTsdT	281	A-115206.1	AGUGAGACCCUCcACCUUGdTsdT	397
AD-56066.1	A-115185.1	AGGuGGAGGGucucAcuuudTsdT	282	A-115186.1	AAAGUGAGACCCUCcACCUdTsdT	398
AD-52456.1	A-108016.1	cuuuccAGcAAAAcuccudTsdT	283	A-108017.1	AGGGAGUUUUGCUGGAAAGdTsdT	399
AD-56054.1	A-115181.1	ccAGcAAAAcuccucAAcdTsdT	284	A-115182.1	GUUGAGGGAGUUUUGCUGdTsdT	400
AD-56035.1	A-115159.1	cAGcAAAAcuccucAAcudTsdT	285	A-115160.1	AGUUGAGGGAGUUUUGCUGdTsdT	401
AD-52462.1	A-108018.1	cAAAAcuccucAAcuGGAdTsdT	286	A-108019.1	UCcAGUUGAGGGAGUUUUGdTsdT	402
AD-56026.1	A-115203.1	uccucAAcuGGAuGAAGAdTsdT	287	A-115204.1	UCUUCcAUCcAGUUGAGGGAdTsdT	403
AD-56022.1	A-115139.1	cccucAAcuGGAuGAAGAAAdTsdT	288	A-115140.1	UUCUUCcAUCcAGUUGAGGGdTsdT	404
AD-55983.1	A-115079.1	ucAAcuGGAuGAAGAAAcudTsdT	289	A-115080.1	AGUUUCUUCcAUCcAGUUGAdTsdT	405
AD-56028.1	A-115235.1	ccGAGcuGAAccuGcAAAAAdTsdT	290	A-115236.1	UUUUGcAGGUUCcAGCUCGGdTsdT	406
AD-55980.1	A-115125.1	cGAGcuGAAccuGcAAAAAdTsdT	291	A-115126.1	UUUUUGcAGGUUCcAGCUCGdTsdT	407
AD-56036.1	A-115175.1	GAAccuGcAAAAAuuGAGcdTsdT	292	A-115176.1	GCUcAAUUUUUGcAGGUUCdTsdT	408
AD-56014.1	A-115105.1	AccuGcAAAAAuuGAGcAAAdTsdT	293	A-115106.1	UUGCUcAAUUUUUGcAGGUdTsdT	409
AD-56007.1	A-115087.1	ccuGcAAAAAuuGAGcAAAdTsdT	294	A-115088.1	AUUGCUcAAUUUUUGcAGGdTsdT	410
AD-56012.1	A-115073.1	cuGcAAAAAuuGAGcAAuGdTsdT	295	A-115074.1	cAUUGCUcAAUUUUUGcAGdTsdT	411
AD-56055.1	A-115197.1	uGcAAAAAuuGAGcAAuGAdTsdT	296	A-115198.1	UcAUUGCUcAAUUUUUGcAdTsdT	412
AD-56029.1	A-115157.1	GcAAAAAuuGAGcAAuGAcdTsdT	297	A-115158.1	GUcAUUGCUcAAUUUUUGCdTsdT	413
AD-52469.1	A-108036.1	GGGuGGGGGAGGuGcuGAAdTsdT	298	A-108037.1	UUcAGcACCUCCCCcACCCdTsdT	414
AD-56053.1	A-115165.1	GGAuGAGAGAGAGcccAcAdTsdT	299	A-115166.1	UGUGGGCUCUCUCUcAUCCdTsdT	415
AD-52468.1	A-108020.1	ccGcccAuuccuGuuuGcudTsdT	300	A-108021.1	AGcAAAcAGGAAUGGGCGGdTsdT	416
AD-56045.1	A-115225.1	AuuccuGuuuGcuGuGuAudTsdT	301	A-115226.1	AuAcAcAGcAAAcAGGAAUdTsdT	417

AD-56056.1	A-115213.1	uccuGuuuGcuGuGuAuGAdTsdT	302	A-115214.1	UcAuAcAcAGcAAAcAGGAdTsdT	418
AD-56010.1	A-115135.1	GuuuGcuGuGuAuGAucAAAdTsdT	303	A-115136.1	UUGAUcAuAcAcAGcAAACdTsdT	419
AD-56015.1	A-115121.1	uuuGcuGuGuAuGAucAAAdTsdT	304	A-115122.1	UUUGAUcAuAcAcAGcAAAdTsdT	420
AD-56039.1	A-115223.1	ccccAGucucccAccuudTsdT	305	A-115224.1	AAAGGUGGGAGACUGGGGdTsdT	421
AD-55991.1	A-115113.1	cccAccuuuuuuuuAAuGdTsdT	306	A-115114.1	cAUuAGAAGAAAAGGUGGGdTsdT	422
AD-52474.1	A-108022.1	ccAccuuuuuuuuAAuGAdTsdT	307	A-108023.1	UcAUuAGAAGAAAAGGUGGdTsdT	423
AD-56024.1	A-115171.1	cAccuuuuuuuuAAuGAGdTsdT	308	A-115172.1	CUcAUuAGAAGAAAAGGUGdTsdT	424
AD-52433.1	A-108024.1	GuuucuccuuGGucuAAGudTsdT	309	A-108025.1	ACUuAGACcAAGGAGAAcAdTsdT	425
AD-56037.1	A-115191.1	uuGcuGGGuuuAuuuuAGAdTsdT	310	A-115192.1	UCuAAAAuAAACCcAGcAdTsdT	426
AD-56049.1	A-115195.1	uGcuGGGuuuAuuuuAGAGdTsdT	311	A-115196.1	CUCuAAAAuAAACCcAGcAdTsdT	427
AD-52439.1	A-108026.1	GcuGGGuuuAuuuuAGAGAdTsdT	312	A-108027.1	UCUCuAAAAuAAACCcAGCAdTsdT	428
AD-55978.1	A-115093.1	cuGGGuuuAuuuuAGAGAAAdTsdT	313	A-115094.1	UUCUCuAAAAuAAACCcAGdTsdT	429
AD-55999.1	A-115147.1	uGGGuuuAuuuuAGAGAAudTsdT	314	A-115148.1	AUUCUCuAAAAuAAACCcAdTsdT	430
AD-56050.1	A-115211.1	GuuuAuuuuAGAGAAuGGGdTsdT	315	A-115212.1	CCcAUUCUCuAAAAuAAACdTsdT	431
AD-56031.1	A-115189.1	uAuuuuAGAGAAuGGGGudTsdT	316	A-115190.1	ACCCCcAUUCUCuAAAAuAdTsdT	432
AD-56027.1	A-115219.1	uGGGGAGGcAAGAAccAGudTsdT	317	A-115220.1	ACUGGUUCUUGCCUCCCcAdTsdT	433
AD-55987.1	A-115143.1	GGAGGcAAGAAccAGuGuudTsdT	318	A-115144.1	AAcACUGGUUCUUGCCUCCdTsdT	434
AD-56043.1	A-115193.1	uccAAAAAGAAuuccAAccdTsdT	319	A-115194.1	GGUUGGAAUUCUUUUGGAdTsdT	435
AD-56001.1	A-115085.1	cAAAAAGAAuuccAAccGAdTsdT	320	A-115086.1	UCGGUUGGAAUUCUUUUGdTsdT	436
AD-52445.1	A-108028.1	ccAAccGAccAGcuuGuuudTsdT	321	A-108029.1	AAAcAAGCUGGUCGGUUGGdTsdT	437
AD-52451.1	A-108030.1	ccGAccAGcuuGuuuGuGAdTsdT	322	A-108031.1	UcAcAAAcAAGCUGGUCGGdTsdT	438
AD-52457.1	A-108032.1	cGAccAGcuuGuuuGuGAAAdTsdT	323	A-108033.1	UUcAcAAAcAAGCUGGUCGdTsdT	439
AD-52463.1	A-108034.1	GAccAGcuuGuuuGuGAAAdTsdT	324	A-108035.1	UUUcAcAAAcAAGCUGGUCdTsdT	440
AD-55982.1	A-115063.1	GcuuGuuuGuGAAAcAAAAAdTsdT	325	A-115064.1	UUUUGUUUcAcAAAcAAGCAdTsdT	441
AD-56019.1	A-115091.1	cuuGuuuGuGAAAcAAAAAdTsdT	326	A-115092.1	UUUUUGUUUcAcAAAcAAGdTsdT	442
AD-55988.1	A-115065.1	uuGuuuGuGAAAcAAAAAdTsdT	327	A-115066.1	UUUUUGUUUcAcAAAcAAAdTsdT	443
AD-55994.1	A-115067.1	GuuuGuGAAAcAAAAAGudTsdT	328	A-115068.1	ACUUUUUGUUUcAcAAACdTsdT	444

AD-56013.1	A-115089.1	uuGuGAAAcAAAAAGuGudTsdT	329	A-115090.1	AcACUUUUUUGUUUcAcAAAdTsdT	445
AD-56065.1	A-115169.1	uGAAAcAAAAAGuGuuccdTsdT	330	A-115170.1	GGAAcACUUUUUGUUUcAdTsdT	446
AD-56008.1	A-115103.1	cAAAAAGuGuuccuuudTsdT	331	A-115104.1	AAAAGGGAAcACUUUUUGdTsdT	447
AD-56048.1	A-115179.1	AAAAAGuGuuccuuucAdTsdT	332	A-115180.1	UGAAAAGGGAAcACUUUUdTsdT	448
AD-56003.1	A-115117.1	AAAAGuGuuccuuucAAAdTsdT	333	A-115118.1	UUGAAAAGGGAAcACUUUUdTsdT	449
AD-56051.1	A-115227.1	uuccuuuucAAGuuGAGAdTsdT	334	A-115228.1	UCUcAACUUGAAAAGGGAdTsdT	450
AD-56044.1	A-115209.1	ccuuuucAAGuuGAGAAcAdTsdT	335	A-115210.1	UGUUCUcAACUUGAAAAGGdTsdT	451
AD-55996.1	A-115099.1	uuucAAGuuGAGAAcAAAAdTsdT	336	A-115100.1	UUUUGUUCUcAACUUGAAAdTsdT	452
AD-56002.1	A-115101.1	uucAAGuuGAGAAcAAAAdTsdT	337	A-115102.1	UUUUUGUUCUcAACUUGAAAdTsdT	453
AD-55976.1	A-115061.1	cAAGuuGAGAAcAAAAuudTsdT	338	A-115062.1	AAUUUUUGUUCUcAACUUGdTsdT	454
AD-56062.1	A-115215.1	AGuuGAGAAcAAAAuGGdTsdT	339	A-115216.1	CcAAUUUUUGUUCUcAACUdTsdT	455
AD-56011.1	A-115151.1	GuuGAGAAcAAAAuGGdTsdT	340	A-115152.1	CCcAAUUUUUGUUCUcAACdTsdT	456
AD-56009.1	A-115119.1	uGAGAAcAAAAuGGGuudTsdT	341	A-115120.1	AACCcAAUUUUUGUUCUcAdTsdT	457
AD-56020.1	A-115107.1	GAGAAcAAAAuGGGuudTsdT	342	A-115108.1	AAACCcAAUUUUUGUUCUCdTsdT	458
AD-55979.1	A-115109.1	GAAcAAAAuGGGuuuAdTsdT	343	A-115110.1	uAAAACCcAAUUUUUGUUCdTsdT	459
AD-55997.1	A-115115.1	AAcAAAAuGGGuuuAAAdTsdT	344	A-115116.1	UuAAAACCcAAUUUUUGUUDTsdT	460
AD-56000.1	A-115069.1	AcAAAAuGGGuuuAAAdTsdT	345	A-115070.1	UUuAAAACCcAAUUUUUGUdTsdT	461
AD-56006.1	A-115071.1	cAAAAuGGGuuuAAAdTsdT	346	A-115072.1	UUUuAAAACCcAAUUUUUGdTsdT	462
AD-55990.1	A-115097.1	AuuGGGuuuAAAAuAAAdTsdT	347	A-115098.1	UUuAAUUuAAAACCcAAUdTsdT	463
AD-55984.1	A-115095.1	uuGGGuuuAAAAuAAAGdTsdT	348	A-115096.1	CUUuAAUUuAAAACCcAAAdTsdT	464
AD-55995.1	A-115083.1	uGGGuuuAAAAuAAAGudTsdT	349	A-115084.1	ACUUuAAUUuAAAACCcAdTsdT	465
AD-56004.1	A-115133.1	uuuAAAAuAAAGuAuAcAdTsdT	350	A-115134.1	UGuAuACUUuAAUUuAAAdTsdT	466
AD-56042.1	A-115177.1	uuAAAAuAAAGuAuAcAudTsdT	351	A-115178.1	AUGuAuACUUuAAUUuAAdTsdT	467
AD-55992.1	A-115129.1	uuGuAuuAGuGucuuGAAAdTsdT	352	A-115130.1	UUcAAGAcACuAAuAcAAAdTsdT	468
AD-55977.1	A-115077.1	uGuAuuAGuGucuuGAAudTsdT	353	A-115078.1	AUUCAGAcACuAAuAcAdTsdT	469
AD-56005.1	A-115149.1	uAGuGucuuGAAuGuAAGAdTsdT	354	A-115150.1	UCUuAcAUUCAGAcACuAdTsdT	470
AD-56052.1	A-115243.1	cuuGAAuGuAAGAAcAuGAdTsdT	355	A-115244.1	UCaUGUUCUuAcAUUCAGdTsdT	471

AD-55985.1	A-115111.1	uuGAAuGuAAGAAcAuGAcdTsdT	356	A-115112.1	GUcAUGUUCUuAcAUUcAAdTsdT	472
AD-56038.1	A-115207.1	cuuAGuuuuuuccAcAGAudTsdT	357	A-115208.1	AUCUGUGGAAAAACuAAGdTsdT	473
AD-56023.1	A-115155.1	ccAcAGAuGcuuGuGAuuudTsdT	358	A-115156.1	AAAUcAcAAGcAUCUGUGGdTsdT	474
AD-56018.1	A-115075.1	AcAGAuGcuuGuGAuuuuudTsdT	359	A-115076.1	AAAAUcAcAAGcAUCUGUdTsdT	475
AD-56060.1	A-115183.1	cuGAAuuucuGuuuGAuGdTsdT	360	A-115184.1	cAUUcAAAcAGAAUUCAGdTsdT	476
AD-55993.1	A-115145.1	AAccAuAGcuGGuuAuuucdTsdT	361	A-115146.1	GAAAUACcAGCuAUGGUUdTsdT	477
AD-55986.1	A-115127.1	ccAuAGcuGGuuAuuucucdTsdT	362	A-115128.1	GAGAAUACcAGCuAUGGdTsdT	478

Таблица 5. Скрининг однократных доз АГТ в клетках Нер3В

	10 нМ средн .	10 нМ SD	0,1 нМ средн.	0,1 нМ SD	0,01 нМ средн.	0,01 нМ SD	Начало относительно NM_000029.3
AD-52457.1	9,4	0,6	13,3	1,3	15,1	2,3	2284
AD-52438.1	3,4	0,1	12,2	1,8	17,7	1,7	1247
AD-52463.1	9,8	0,9	16,9	2,9	19,3	2,1	2285
AD-52433.1	7,4	1,5	14,4	1,0	24,8	1,3	2125
AD-52439.1	15,1	1,1	23,9	0,2	29,9	1,4	2201
AD-52449.1	5,7	0,6	22,7	1,2	42,4	5,3	841
AD-52451.1	10,4	0,5	29,0	1,1	47,4	1,1	2283
AD-52474.1	5,0	0,3	30,6	2,2	49,1	1,9	2081
AD-52462.1	6,1	0,1	23,7	2,7	50,8	1,6	1595
AD-52445.1	11,0	0,3	24,2	1,4	55,1	0,4	2279
AD-52456.1	11,9	0,3	38,7	0,5	71,7	1,4	1587
AD-52469.1	15,9	0,6	40,6	3,1	84,1	0,8	1767
AD-52461.1	62,8	1,1	78,5	0,3	85,0	0,6	849
AD-52443.1	16,9	0,0	49,4	2,0	88,4	3,0	828
AD-52468.1	27,6	1,5	85,1	3,7	91,6	1,4	1879
AD-52431.1	24,6	3,7	75,2	1,8	92,3	3,1	491
AD-52444.1	67,0	2,8	74,4	0,3	94,1	0,2	1403
AD-52455.1	57,0	0,5	89,5	4,1	94,4	1,6	844
AD-52432.1	70,6	2,3	93,6	8,2	95,7	3,7	1214
AD-52473.1	46,4	0,2	75,6	0,2	95,8	0,1	910
AD-52450.1	20,3	1,7	53,0	2,5	96,3	4,8	1417
AD-52437.1	36,3	4,1	86,6	0,6	96,6	0,9	643
AD-52467.1	59,5	0,8	94,5	1,7	102,9	5,1	863
AD-55976.1			3,6	5,8			2323
AD-55977.1			77,2	70,0			2385
AD-55978.1			8,3	11,8			2202
AD-55979.1			7,7	9,1			2331
AD-55980.1			14,1	17,4			1729
AD-55981.1			21,2	29,4			1566
AD-56023.1			74,1	77,1			2450
AD-56024.1			17,6	27,8			2082
AD-56025.1			66,5	75,0			855
AD-56026.1			13,7	20,2			1601
AD-56027.1			16,9	22,2			2227
AD-56028.1			63,8	74,0			1728
AD-55982.1			22,9	26,1			2290
AD-55983.1			6,2	8,7			1605

AD-55984.1			52,0	59,9			2340
AD-55985.1			70,1	65,1			2398
AD-55986.1			80,5	79,3			2521
AD-55987.1			12,5	15,5			2230
AD-56029.1			51,3	62,2			1741
AD-56030.1			53,3	58,0			822
AD-56031.1			38,1	43,7			2204
AD-56032.1			12,6	15,3			1570
AD-56033.1			99,8	100,7			1408
AD-56034.1			87,8	93,0			825
AD-55988.1			46,4	49,5			2292
AD-55989.1			5,8	9,7			1251
AD-55990.1			6,5	5,0			2339
AD-55991.1			50,4	38,2			2080
AD-55992.1			76,4	60,5			2384
AD-55993.1			66,5	62,9			2519
AD-56035.1			17,9	17,6			1592
AD-56036.1			47,7	59,9			1735
AD-56037.1			80,8	83,5			2199
AD-56038.1			84,8	90,4			2439
AD-56039.1			47,9	66,7			2070
AD-56040.1			95,0	98,3			1260
AD-55994.1			3,6	5,5			2294
AD-55995.1			31,4	47,8			2341
AD-55996.1			5,1	5,0			2320
AD-55997.1			83,3	76,6			2332
AD-55999.1			74,6	75,0			2203
AD-56041.1			21,9	21,4			485
AD-56042.1			73,3	73,5			2347
AD-56043.1			53,1	57,8			2266
AD-56044.1			12,0	13,9			2317
AD-56045.1			41,7	48,8			1885
AD-56046.1			83,0	90,1			1002
AD-56000.1			13,3	20,3			2333
AD-56001.1			4,7	5,7			2268
AD-56002.1			5,4	6,6			2321
AD-56003.1			4,2	4,4			2307
AD-56004.1			54,0	68,5			2346
AD-56005.1			60,2	62,2			2391
AD-56047.1			24,7	28,2			635
AD-56048.1			7,1	7,4			2306

AD-56049.1			73,0	62,6			2200
AD-56050.1			96,4	102,1			2206
AD-56051.1			17,4	23,0			2314
AD-56052.1			85,1	102,5			2397
AD-56006.1			8,1	10,7			2334
AD-56007.1			17,8	19,1			1738
AD-56008.1			5,4	4,8			2304
AD-56009.1			12,2	14,4			2328
AD-56010.1			62,1	69,0			1891
AD-56011.1			35,3	40,3			2326
AD-56053.1			5,0	6,7			1810
AD-56054.1			30,9	35,5			1591
AD-56055.1			61,4	50,9			1740
AD-56056.1			83,6	94,0			1887
AD-56057.1			85,7	97,9			606
AD-56058.1			68,6	87,4			1413
AD-56012.1			35,0	47,1			1739
AD-56013.1			49,2	57,6			2296
AD-56014.1			54,4	60,3			1737
AD-56015.1			42,2	46,7			1892
AD-56016.1			11,2	15,6			1249
AD-56017.1			10,6	12,9			834
AD-56059.1			37,3	45,2			1248
AD-56060.1			94,1	94,3			2497
AD-56061.1			99,8	94,6			878
AD-56062.1			19,2	32,2			2325
AD-56063.1			102,2	102,8			911
AD-56064.1			80,2	92,3			644
AD-56018.1			72,0	74,5			2452
AD-56019.1			25,2	27,7			2291
AD-56020.1			10,2	15,3			2329
AD-56021.1			36,0	40,9			658
AD-56022.1			37,5	52,7			1602
AD-56065.1			56,5	71,9			2299
AD-56066.1			12,3	18,9			1572
AD-56067.1			64,9	81,8			741
AD-56068.1			68,6	82,1			1250
AD-56069.1			48,9	72,7			1277

Таблица 6. Данные IC50 AGT в клетках Нер3В

Название дуплекса	IC ₅₀ (нМ)
AD-52431	5,719

AD-52432	> 10 нМ
AD-52433	0,057
AD-52437	> 10 нМ
AD-52438	0,063
AD-52439	0,192
AD-52443	0,504
AD-52444	> 10 нМ
AD-52445	0,183
AD-52449	0,211
AD-52450	2,052
AD-52451	0,318
AD-52455	> 10 нМ
AD-52456	1,569
AD-52461	> 10 нМ
AD-52462	0,242
AD-52463	0,112
AD-52467	> 10 нМ
AD-52468	> 10 нМ
AD-52469	0,540
AD-52473	> 10 нМ
AD-52474	0,323
AD-55983	0,017
AD-55983	0,020
AD-55989	0,017
AD-55989	0,019
AD-56016	0,018
AD-56016	0,019
AD-56017	0,027
AD-56017	0,031
AD-56053	0,007
AD-56053	0,009

Таблица 7. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей дцРНК АГТ (21/23-членные олигомеры)

Название дуплекса	Положение относительно NM_000029.3	Название смысловой	Смысловая последовательность	SEQ ID №	Название антисмысловой	Положение относительно NM_000029.3	Antisense Sequence	SEQ ID №
UM AD-60803.1	830-850	A-122599.1	CGGGAUGCUGGCCAACUUCUU	479	A-122600.1	828-850	AAGAAGUUGGCCAGCAUC CCGAC	517
UM AD-60775.1	843-863	A-122541.1	AACUUCUUGGGCUUCGUAUA	480	A-122542.1	841-863	UAUACGGAAGCCCAAGAA GUUGG	518
UM AD-60779.1	855-875	A-122605.1	UUCGGUAUAUAUGGCAUGCAA	481	A-122606.1	853-875	UUGCAUGCCAUUAUAUACG GAAGC	519
UM AD-60797.1	857-877	A-122581.1	CCGUUAUAUAUGGCAUGCAAA	482	A-122582.1	855-877	UUGUGCAUGCCAUUAUAUA CGGAA	520
UM AD-60806.1	880-900	A-122585.1	AGCUAUGGGGCGUGGUCCAUA	483	A-122586.1	878-900	UAUGGACCACGCCCAUA GCUCA	521
UM AD-60787.1	912-932	A-122577.1	CUCUCCCCAACGGCUGUCUUU	484	A-122578.1	910-932	AAAGACAGCCGUUGGGGA GAGGA	522
UM AD-60807.1	913-933	A-122601.1	UCUCCCCAACGGCUGUCUUUA	485	A-122602.1	911-933	UAAAGACAGCCGUUGGGG AGAGG	523
UM AD-60794.1	1276-1296	A-122611.1	UGCAGGCUGUGACAGGAUGGA	486	A-122612.1	1274-1296	UCCAUCCUGUCACAGCCU GCAUG	524
UM AD-60796.1	1568-1588	A-122565.1	CCUGGACAAGGUGGAGGGUCU	487	A-122566.1	1566-1588	AGACCCUCCACCUUGUCC AGGUC	525
UM AD-60778.1	1572-1592	A-122589.1	GACAAGGUGGAGGGUCUCACU	488	A-122590.1	1570-1592	AGUGAGACCCUCCACCUU GUCCA	526

UM AD-60792.1	1574-1594	A- 122579.1	CAAGGUGGAGGGUCUCAC UUU	489	A-122580.1	1572-1594	AAAGUGAGACCCUCCACC UUGUC	527
UM AD-60772.1	1594-1614	A- 122571.1	UCCAGCAAAACUCCCUCA ACU	490	A-122572.1	1592-1614	AGUUGAGGGAGUUUUGCU GGAAA	528
UM AD-60773.1	1603-1623	A- 122587.1	ACUCCCUCAACUGGAUGA AGA	491	A-122588.1	1601-1623	UCUUCAUCCAGUUGAGGG AGUUU	529
UM AD-60782.1	1737-1757	A- 122575.1	CUGAACCCUGCAAAAAUUG AGA	492	A-122576.1	1735-1757	UCUCAUUUUUUGCAGGUU CAGCU	530
UM AD-60800.1	1739-1759	A- 122551.1	GAACCUGCAAAAAUUGAG CAA	493	A-122552.1	1737-1759	UUGCUCAAUUUUUGCAGG UUCAG	531
UM AD-60785.1	1741-1761	A- 122545.1	ACCUGCAAAAAUUGAGCA AUA	494	A-122546.1	1739-1761	UAUUGCUCAAUUUUUGCA GGUUC	532
UM AD-60802.1	1742-1762	A- 122583.1	CCUGCAAAAAUUGAGCAA UGA	495	A-122584.1	1740-1762	UCAUUGCUCAAUUUUUGC AGGUU	533
UM AD-60799.1	1812-1832	A- 122613.1	GCGGAUGAGAGAGAGCCC ACA	496	A-122614.1	1810-1832	UGUGGGCUCUCUCUCAUC CGCUU	534
UM AD-60781.1	1894-1914	A- 122559.1	UGUUUGCUGUGUAUGAUC AAA	497	A-122560.1	1892-1914	UUUGAUCAUACACAGCAA ACAGG	535
UM AD-60793.1	2072-2092	A- 122595.1	CACCCCCAGUCUCCACC UUU	498	A-122596.1	2070-2092	AAAGGUGGGAGACUGGGG GUGAC	536
UM AD-60784.1	2081-2101	A- 122607.1	UCUCCCACUUUUUCUUCU AAU	499	A-122608.1	2079-2101	AUUAGAAGAAAAGGUGGG AGACU	537
UM AD-60777.1	2084-2104	A- 122573.1	CCCACUUUUUCUUCUAAU GAA	500	A-122574.1	2082-2104	UUCAUUAGAAGAAAAGGU GGGAG	538
UM AD-60795.1	2270-2290	A- 122549.1	UCCAAAAAGAAUCCAAC CGA	501	A-122550.1	2268-2290	UCGGUUGGAAUUCUUUUU GGAAC	539
UM AD-60783.1	2281-2301	A-	UUCCAACCGACCAGCUUG	502	A-122592.1	2279-2301	AAACAAGCUGGUCGGUUG	540

		122591.1	UUU				GAAUU	
UM AD-60788.1	2286-2306	A- 122593.1	ACCGACCAGCUUGUUUGU GAA	503	A-122594.1	2284-2306	UUCACAAACAAGCUGGUC GGUUG	541
UM AD-60789.1	2291-2311	A- 122609.1	CCAGCUUGUUUGUGAAAC AAA	504	A-122610.1	2289-2311	UUUGUUUCACAAACAAGC UGGUC	542
UM AD-60770.1	2292-2312	A- 122539.1	CAGCUUGUUUGUGAAACA AAA	505	A-122540.1	2290-2312	UUUUGUUUCACAAACAAG CUGGU	543
UM AD-60776.1	2309-2329	A- 122557.1	AAAAAAGUGUCCCUUUU CAA	506	A-122558.1	2307-2329	UUGAAAAGGGAACACUUU UUUGU	544
UM AD-60798.1	2316-2336	A- 122597.1	UGUUCUUUUUCAAGUUG AGA	507	A-122598.1	2314-2336	UCUCAACUUGAAAAGGGA ACACU	545
UM AD-60801.1	2328-2348	A- 122567.1	AAGUUGAGAACAAAAAUU GGA	508	A-122568.1	2326-2348	UCCAAUUUUUGUUCUCA CUUGA	546
UM AD-60791.1	2329-2349	A- 122563.1	AGUUGAGAACAAAAUUG GGU	509	A-122564.1	2327-2349	ACCCAAUUUUUGUUCUCA ACUUG	547
UM AD-60771.1	2334-2354	A- 122555.1	AGAACAAAAAUUGGGUUU UAA	510	A-122556.1	2332-2354	UUAAAACCCAAUUUUUGU UCUCA	548
UM AD-60780.1	2335-2355	A- 122543.1	GAACAAAAAUUGGGUUUU AAA	511	A-122544.1	2333-2355	UUUAAAACCCAAUUUUUG UUCUC	549
UM AD-60786.1	2386-2406	A- 122561.1	GUUUGUAUUUAGUGUCUU GAA	512	A-122562.1	2384-2406	UUCAAGACACUAAAUACA AACCG	550
UM AD-60790.1	2387-2407	A- 122547.1	UUUGUAUUUAGUGUCUUG AAU	513	A-122548.1	2385-2407	AUUCAAGACACUAAAUAC AAACC	551
UM AD-60774.1	2399-2419	A- 122603.1	GUCUUGAAUGUAAGAACA UGA	514	A-122604.1	2397-2419	UCAUGUUCUUACAUUCA GACAC	552
UM AD-60804.1	2400-2420	A- 122553.1	UCUUGAAUGUAAGAACAU GAA	515	A-122554.1	2398-2420	UUCAUGUUCUUACAUUCA AGACA	553

UM AD-60805.1	2452-2472	A- 122569.1	UCCACAGAUGCUUGUGA UUU	516	A-122570.1	2450-2472	AAAUCACAAGCAUCUGUG GAAAA	554
---------------	-----------	----------------	--------------------------	-----	------------	-----------	-----------------------------	-----

Таблица 8. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи дцРНК АГТ (21/23-членные олигомеры)

Название дуплекса	Название смысловой	Смысловая последовательность	SEQ ID №	Название антисмысловой	Антисмысловая последовательность	SEQ ID №
AD-60770.1	A-122539.1	CfsasGfcUfuGfuUfuGfuGfaAfaCfaAfa AfL96	555	A-122540.1	usUfsuUfgUfuUfcAfcaaAfcAfaGfcUfg sgsu	593
AD-60771.1	A-122555.1	AfsgsAfaCfaAfaAfaUfuGfgGfuUfuUfa AfL96	556	A-122556.1	usUfsaAfaAfcCfcAfauUfuUfgUfuCfu scsa	594
AD-60772.1	A-122571.1	UfscsCfaGfcAfaAfaCfuCfcCfuCfaAfc UfL96	557	A-122572.1	asGfsuUfgAfgGfgAfguuUfuGfcUfgGfa sasa	595
AD-60773.1	A-122587.1	AfscsUfcCfcUfcAfaCfuGfgAfuGfaAfg AfL96	558	A-122588.1	usCfsuUfcAfuCfcAfguuGfaGfgGfaGfu susu	596
AD-60774.1	A-122603.1	GfsusCfuUfgAfaUfgUfaAfgAfaCfaUfg AfL96	559	A-122604.1	usCfsaUfgUfuCfuUfacaUfuCfaAfgAfc sasc	597
AD-60775.1	A-122541.1	AfsasCfuUfcUfuGfgGfcUfuCfcGfuAfu AfL96	560	A-122542.1	usAfsuAfcGfgAfaGfcccAfaGfaAfgUfu sgsg	598
AD-60776.1	A-122557.1	AfsasAfaAfaGfuGfuUfuCfcUfuUfuCfa AfL96	561	A-122558.1	usUfsgAfaAfaGfgGfaacAfcUfuUfuUfu sgsu	599
AD-60777.1	A-122573.1	CfscsCfaCfcUfuUfuCfuUfcUfaAfuGfa AfL96	562	A-122574.1	usUfscAfuUfaGfaAfgaaAfaGfgUfgGfg sasg	600
AD-60778.1	A-122589.1	GfsasCfaAfgGfuGfgAfgGfgUfcUfcAfc UfL96	563	A-122590.1	asGfsuGfaGfaCfcCfuccAfcCfuUfgUfc scsa	601
AD-60779.1	A-122605.1	UfsusCfcGfuAfuAfuAfuGfgCfaUfgCfa AfL96	564	A-122606.1	usUfsgCfaUfgCfcAfuauAfuAfcGfgAfa sgsc	602

AD- 60780.1	A- 122543.1	GfsasAfcAfaAfaAfUfUfgGfgUfuUfuAfa AfL96	565	A-122544.1	usUfsuAfaAfaCfcCfaauUfuUfuGfuUfc susc	603
AD- 60781.1	A- 122559.1	UfsgsUfuUfgCfuGfUfGfuAfuGfaUfcAfa AfL96	566	A-122560.1	usUfsuGfaUfcAfuAfcacAfgCfaAfaCfa sgsg	604
AD- 60782.1	A- 122575.1	CfsusGfaAfcCfuGfCfAfaAfaAfuUfgAfg AfL96	567	A-122576.1	usCfsuCfaAfuUfuUfugcAfgGfuUfcAfg scsu	605
AD- 60783.1	A- 122591.1	UfsusCfcAfaCfcGfAfcAfcAfgCfuUfgUfu UfL96	568	A-122592.1	asAfsaCfaAfgCfuGfgucGfgUfuGfgAfa susu	606
AD- 60784.1	A- 122607.1	UfscsUfcCfcAfcCfuUfuUfcUfuCfuAfa UfL96	569	A-122608.1	asUfsuAfgAfaGfaAfaagGfuGfgGfaGfa scsu	607
AD- 60785.1	A- 122545.1	AfscsCfuGfcAfaAfaAfuUfgAfgCfaAfu AfL96	570	A-122546.1	usAfsuUfgCfuCfaAfuuuUfuGfcAfgGfu susc	608
AD- 60786.1	A- 122561.1	GfsusUfuGfuAfuUfUfAfgUfgUfcUfuGfa AfL96	571	A-122562.1	usUfscAfaGfaCfaCfuuaAfuAfcAfaAfc scsg	609
AD- 60787.1	A- 122577.1	CfsusCfuCfcCfcAfaAfcfgGfcUfgUfcUfu UfL96	572	A-122578.1	asAfsaGfaCfaGfcCfuuGfgGfgAfgAfg sgsa	610
AD- 60788.1	A- 122593.1	AfscsCfgAfcCfaGfCfuUfuGfuUfuGfuGfa AfL96	573	A-122594.1	usUfscAfcAfaAfcAfcagcUfgGfuCfgGfu susg	611
AD- 60789.1	A- 122609.1	CfscsAfgCfuUfgUfUfUfgUfgAfaAfcAfa AfL96	574	A-122610.1	usUfsuGfuUfuCfaCfaaaCfaAfgCfuGfg susc	612
AD- 60790.1	A- 122547.1	UfsusUfgUfaUfuUfAfgfuGfuCfuUfgAfa UfL96	575	A-122548.1	asUfsuCfaAfgAfcAfcuaAfaUfaCfaAfa scsc	613
AD- 60791.1	A- 122563.1	AfsgsUfuGfaGfaAfcAfaAfaAfuUfgGfg UfL96	576	A-122564.1	asCfscCfaAfuUfuUfuguUfcUfcAfaCfu susg	614
AD- 60792.1	A- 122579.1	CfsasAfgGfuGfgAfgGfgUfcUfcAfcUfu UfL96	577	A-122580.1	asAfsaGfuGfaGfaCfccuAfcAfcCfuUfg susc	615
AD- 60793.1	A- 122596.1	CfsasCfcCfcCfaGfuUfcfuCfcCfaCfcUfu UfL96	578	A-122596.1	asAfsaGfgUfgGfgAfgacUfgGfgGfgUfg susc	616

60793.1	122595.1	UfL96			sasc	
AD- 60794.1	A- 122611.1	UfsgsCfaGfgCfuGfUfGfaCfaGfgAfuGfg AfL96	579	A-122612.1	usCfscAfuCfcUfgUfcacAfgCfcUfgCfa susg	617
AD- 60795.1	A- 122549.1	UfscsCfaAfaAfaGfAfAfuUfcCfaAfcCfg AfL96	580	A-122550.1	usCfsgGfuUfgGfaAfuucUfuUfuUfgGfa sasc	618
AD- 60796.1	A- 122565.1	CfscsUfgGfaCfaAfGfGfuGfgAfgGfgUfc UfL96	581	A-122566.1	asGfscAfcCfcCfcAfccuUfgUfcCfaGfg susc	619
AD- 60797.1	A- 122581.1	CfscsGfuAfuAfuAfuUfGfgCfaUfgCfaCfa AfL96	582	A-122582.1	usUfsgUfgCfaUfgCfcuAfuAfuAfcGfg sasa	620
AD- 60798.1	A- 122597.1	UfsgsUfuCfcCfuUfUfUfcAfaGfuUfgAfg AfL96	583	A-122598.1	usCfsuCfaAfcUfuGfaaaAfgGfgAfaCfa scsu	621
AD- 60799.1	A- 122613.1	GfscsGfgAfuGfaGfAfGfaGfaGfcCfcAfc AfL96	584	A-122614.1	usGfsuGfgGfcUfcUfcucUfcAfuCfcGfc susu	622
AD- 60800.1	A- 122551.1	GfscsAfcCfuGfcAfAfAfaAfuUfgAfgCfa AfL96	585	A-122552.1	usUfsgCfuCfaAfuUfuuuGfcAfgGfuUfc sasg	623
AD- 60801.1	A- 122567.1	AfscsGfuUfgAfgAfAfCfaAfaAfaUfuGfg AfL96	586	A-122568.1	usCfscAfaUfuUfuUfguuCfuCfaAfcUfu sgsa	624
AD- 60802.1	A- 122583.1	CfscsUfgCfaAfaAfAfUfuGfaGfcAfaUfg AfL96	587	A-122584.1	usCfscAfuGfcUfcAfaUfuUfgCfaGfg susu	625
AD- 60803.1	A- 122599.1	CfsgsGfgAfuGfcUfGfGfcCfaAfcUfuCfu UfL96	588	A-122600.1	asAfsGfaGfuUfgGfccGfcAfuCfcCfg sasc	626
AD- 60804.1	A- 122553.1	UfscsUfuGfaAfuGfUfAfaGfaAfcAfuGfa AfL96	589	A-122554.1	usUfscAfuGfuUfcUfuacAfuUfcAfaGfa scsa	627
AD- 60805.1	A- 122569.1	UfsusCfcAfcAfgAfUfGfcUfuGfuGfaUfu UfL96	590	A-122570.1	asAfsaUfcAfcAfaGfcuAfuGfuGfgAfa sasa	628
AD- 60806.1	A- 122585.1	AfsgsCfuAfuGfgGfGfcUfgGfuCfcAfu AfL96	591	A-122586.1	usAfsuGfgAfcCfaCfcccCfcAfuAfgCfu scsa	629

AD- 60807.1	A- 122601.1	UfscsUfcCfcCfaAfCfGfgCfuGfuCfuUfu AfL96	592	A-122602.1	usAfsaAfgAfcAfgCfcguUfgGfgGfaGfa sgsg	630
----------------	----------------	--	-----	------------	--	-----

Таблица 9. Скрининг однократных доз АГТ в клетках Нер3В
(21/23-членные олигомеры)

Название дуплекса	10 нМ средн .	10 нМ SD	0,1 нМ средн.	0,1 нМ SD	Начальное положение относительно NM_000029.3
AD-60770.1	4,7	0,7	27,4	7,4	2292
AD-60771.1	4,6	1,2	10,9	5,9	2334
AD-60772.1	14,8	7,9	63,7	13,2	1594
AD-60773.1	43,9	8,7	88,8	5,4	1603
AD-60774.1	64,0	3,8	79,1	4,2	2399
AD-60775.1	8,4	2,8	62,2	8,8	843
AD-60776.1	5,9	2,8	11,1	5,1	2309
AD-60777.1	4,3	1,7	26,7	5,3	2084
AD-60778.1	11,5	7,4	52,5	15,5	1572
AD-60779.1	5,2	2,8	24,1	4,1	855
AD-60780.1	5,7	2,3	12,0	5,2	2335
AD-60781.1	6,9	2,1	18,5	3,1	1894
AD-60782.1	9,2	5,0	47,0	8,6	1737
AD-60783.1	15,9	9,0	35,7	7,6	2281
AD-60784.1	5,6	1,0	12,3	2,5	2081
AD-60785.1	6,1	0,9	29,7	13,7	1741
AD-60786.1	56,9	5,4	74,0	5,1	2386
AD-60787.1	94,4	0,7	104,4	6,0	912
AD-60788.1	10,5	3,6	49,8	4,8	2286
AD-60789.1	5,2	2,0	25,3	16,0	2291
AD-60790.1	70,4	3,3	86,3	19,7	2387
AD-60791.1	7,8	3,7	33,4	18,0	2329
AD-60792.1	17,0	3,3	72,8	9,0	1574
AD-60793.1	18,4	5,6	58,3	12,5	2072
AD-60794.1	54,3	11,5	101,6	4,3	1276
AD-60795.1	6,2	3,4	36,3	8,6	2270
AD-60796.1	41,6	3,3	100,9	8,6	1568
AD-60797.1	72,5	2,8	97,1	6,1	857
AD-60798.1	13,2	4,8	29,1	16,4	2316
AD-60799.1	29,7	7,5	86,2	4,2	1812
AD-60800.1	31,0	7,5	81,8	11,2	1739
AD-60801.1	10,9	2,2	35,4	11,3	2328
AD-60802.1	14,8	5,5	52,8	9,7	1742
AD-60803.1	29,2	10,9	71,4	9,6	830
AD-60804.1	39,2	2,9	75,6	6,1	2400
AD-60805.1	60,3	10,1	97,4	2,3	2452

AD-60806.1	89,3	11,8	92,8	6,5	880
AD-60807.1	64,1	3,7	91,5	10,1	913

Таблица 10 – Данные IC₅₀ AGT в клетках НерЗВ (21/23-членные олигомеры)

Название дуплекса	IC ₅₀ (нМ)
AD-60771.1	0,028
AD-60776.1	0,033
AD-60780.1	0,038
AD-60784.1	0,045
AD-60781.1	0,089

Пример 2. Выключение гена AGT *in vivo* – уменьшение интенсивности последствий предэклампсии

Трансгенным самкам крыс Sprague-Dawley, несущим полный геномный ген AGT человека (например, [TGR(hAGT)L1623] (см., например, Bohlender J., et al. (1996) Hypertension 27: 535-540 и Bohlender J., et al. (2000) J Am Soc Nephrol 11: 2056-2061)), хирургически имплантировали устройство для измерения кровяного давления посредством телеметрии. После восстановления от процедуры, этих крыс скрещивали с трансгенными самцами крыс Sprague-Dawley, несущими полный геномный ген REN человека (например, [TGR(hREN)L10J] (см., например, Bohlender J, et al. (1997) Hypertension 29: 428-434 и Bohlender J., et al. (2000) J Am Soc Nephrol 11: 2056-2061)). Женское потомство от этого скрещивания (обозначаемое в настоящем документе как «PE крысы») представляет собой модель предэклампсии и развивает альбуминурию и задержку внутриутробного развития (IUGR), и имеет начало пиков кровяного давления приблизительно на 13 сутки беременности (см., например, фиг. 2А).

Начиная с 3 суток беременности подгруппе беременных PE крыс вводили 10 мг/кг миРНК, направленной на hAGT (AD-60771). Вторую подгруппу беременных PE крыс оставляли без лечения в качестве контроля. Дозирование продолжали каждые третьи сутки до 15 суток беременности. Крыс умерщвляли приблизительно на 19 сутки беременности и брали образцы крови и тканей матери и плода.

Осуществляли мониторинг кровяного давления матери на всем протяжении эксперимента через хирургически имплантированные

устройства для измерения кровяного давления посредством телеметрии. На фиг. 2А показано, что после введения AD-60771, среднее артериальное кровяное давление матери было значительно понижено. Кроме того, как определяли с помощью ELISA анализа сывороточного альбумина, происходило значительное снижение альбуминурии матери после введения AD-60771 (фиг. 2В). Эти два состояния являются признаками предэклампсии. Сниженное кровяное давление уменьшает сердечнососудистые события, связанные с заболеванием, тогда как сниженная альбуминурия указывает на улучшенную почечную функцию.

Предэклампсия также связана со уменьшенным размером плаценты, что возможно связано с плохой перфузией. В результате этого состояния происходит снижение роста плода. Однако после введения AD-60771 матери происходит увеличение маточно-плацентарного удельного веса (фиг. 3А) и массы плода (фиг. 3В) и имеет место нормализация соотношения головного мозга и печени плода (фиг. 3С), все это указывает на более нормальное развитие плаценты и плода.

Как определяют с помощью RT-qPCR анализа экспрессии мРНК hAGT в печени матери и плаценте, показано, что, хотя имеет место существенное выключение гена hAGT в печени матери (фиг. 4А), в плаценте значительное выключение гена отсутствует (фиг. 4В). Это указывает на отсутствие проникновения иРНК в плаценту.

Кроме того, анализ четырех образцов печени матери, четырех образцов плаценты и восьми образцов печени плода показал, что воздействие иРНК на печень плода составляло приблизительно 1,2 нг миРНК/г (ниже предела обнаружения, 1,3 нг миРНК/г ткани) ткани и что воздействие иРНК на печень матери составляло приблизительно в 265 раз больше, чем воздействие иРНК на плаценту (фиг. 5). Воздействие на ткань определяли с помощью количественной ПЦР с петлей на стебле, как описано ранее (см., например, Landesman, Y., et al. (2010) *Silence* 1:16).

Таким образом, лечение матери с использованием иРНК, направленной на hAGT, преобладает над лечением матери с использованием низкомолекулярных ингибиторов ренина-ангиотензина, таких как ингибиторы АСЕ, и блокаторов рецептора

ангиотензина, поскольку эти соединения проходят через плаценту и обладают фетотоксичностью.

Поскольку плацента выполняет функцию проводника для питательных веществ к плоду и удаления отходов от плода, ее состав является критическим. Соответственно, оценивали патологию плаценты (т. е., посредством измерения площади тканевых срезов после иммуногистохимического окрашивания на цитокератин). Фиг. 6 демонстрирует, что хотя материнская часть плаценты (мезометриальный треугольник; фиг. 6D) и трофоспонгий (однородный слой клеток, которые являются предшественниками дифференцированных трофобластов; фиг. 6E) не изменены посредством введения AD-60771, общий размер плаценты увеличен (фиг. 6B, 6C и 6F и фиг. 6A для сравнения). В частности, происходило увеличение размера лабиринта, который является местом алиментарного обмена между кровью плода и матери, посредством лечения матери с использованием AD-60771 (фиг. 6G).

Антиангиогенная растворимая fms-подобная тирозинкиназа-1 (sFLT1) и ангиогенный плацентарный фактор роста (PLGF), которые регулируются ангиотензинами, играют ключевую роль в предэклампсии, высвобождаясь из плаценты в кровотоки матери и вызывая нарушение функции эндотелия. sFlt-1 главным образом высвобождается из плаценты в кровотоки матери и вызывает нарушение функции эндотелия. PLGF имеет плацентарное происхождение и способствует ангиогенезу. Соотношение sFlt-1:PLGF является диагностическим, причем более высокое sFlt-1:PLGF связано с более тяжелым заболеванием.

Оценка экспрессии мРНК sFLT1 и PLGF с помощью RT-qPCR анализа продемонстрировала, что в почке матери уровни как sFLT1, так и PLGF были значительно понижены (фиг. 7A и 7B, соответственно), но оставались неизменными в плаценте (фиг. 7C и 7D, соответственно) после введения AD-60771 матери. Однако, когда снижение sFlt-1 происходило в большей степени, чем PLGF в почке матери, соотношение sFlt-1:PLGF в сыворотке могло улучшаться.

Агонистические аутоантитела к рецептору ангиотензина II типа 1 (AT1) идентифицировали у женщин с предэклампсией. Когда

беременных грызунов подвергали воздействию аутоантител к AT1, происходило развитие синдрома, похожего на предэклампсию. Поскольку активация AT1 связана с вазопрессорными эффектами, а также секрецией альдостерона и продуцированием sFlt-1, снижение аутоантител к AT1, как ожидают, ослабляет предэкламптический фенотип. Соответственно, уровень продуцирования агонистических аутоантител к рецептору AT1 (AT1-AA) также можно оценивать с помощью биохроматографии и последующего биоанализа выделенных антител. Уровни AT1-AA измеряли, как описано (см., например, Dechend, et al. (2005) *Hypertension* 45:742-746), посредством оценки влияния выделенных очищенных AT1-AA антител на частоту самопроизвольного биения кардиомиоцитов неонатальной крысы. Фиг. 8 демонстрирует, что имело место значительное снижение уровня AT1-AA после введения AD-60771 беременным PE крысам.

Пример 3. Выключение гена AGT *in vivo* в модели предэклампсии на трансгенных крысах

Дуплекс AD-60771 тестировали на способность выключать экспрессию hAGT у беременных PE крыс, описанных в предыдущем примере. Начиная с 3 суток беременности подгруппе беременных PE крыс вводили 10 мг/кг мРНК, направленной на hAGT (AD-60771). Печень и кровь брали в 21 сутки беременности и уровни белка и мРНК hAGT и rAGT анализировали и сранивали с уровнями белка и мРНК hAGT и rAGT, присутствующими у беременных трансгенных крыс, беременных крыс Sprague-Dawley и небеременных крыс Sprague-Dawley, не получавших лечение. Результаты этих анализов представлены на фиг. 9А и 9В, которые демонстрируют, что имело место 80% снижение циркулирующего AT2 и 95% снижение циркулирующего hAT1 у беременных PE крысы, получавших лечение AD-60771, по сравнению с контрольными беременными PE крысами. Снижение AT2 крысы приблизительно на 45% также наблюдали у беременных PE крыс, которых лечили AD-60771, по сравнению с контрольными беременными PE крысами. Выключение гена на 95% на печеночной мРНК AGT наблюдали у беременных PE крыс, которых лечили AD-60771, по сравнению с контрольными беременными PE крысами. На фиг. 9А и 9В также продемонстрировано, что имело место значительное снижение уровня AT1 и AT2 в сыворотке после

введения

AD-60771

беременным

РЕ

крысам.

Таблица 11. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей дцРНК АГТ (21/23-членные олигомеры)

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Последовательность	SEQ ID №	Название антисмыслового олигонуклеотида	Последовательность	SEQ ID №	Местоположение на NM_000029.3
AD-67864.1	A-135936.1	CGGGCAGCAGGGUCAGAA A	631	A-135937.1	UUUCUGACCCUGCUGCCC G	828	10-28
AD-67865.1	A-135938.1	UCAGAAGUGGCCCCGUG U	632	A-135939.1	ACACGGGGGCCACUUCUG A	829	22-40_as
AD-67866.1	A-135940.1	CCCUGUUGCCUAAGCAA A	633	A-135941.1	UUUGCUUAGGCAACACGG G	830	34-52_G19A_as
AD-67867.1	A-135948.1	UGCACCUCCGGCCUGCAU A	634	A-135949.1	UAUGCAGGCCGGAGGUGC A	831	76-94_G19A_as
AD-67868.1	A-135950.1	UGCAUGUCCUGUGGCCU A	635	A-135951.1	UAGGCCACAGGGACAUGC A	832	89-107
AD-67869.1	A-135952.1	UGUGGCCUCUUGGGGGUA A	636	A-135953.1	UUACCCCAAGAGGCCAC A	833	99-117
AD-67870.1	A-135958.1	GGUCAGAAGGCCUGGGUG A	637	A-135959.1	UCACCCAGGCCUUCUGAC C	834	132-150_G19A_as
AD-67871.1	A-135960.1	UGGGUGGUUGGCCUCAGG A	638	A-135961.1	UCCUGAGGCCAACCACCC A	835	144-162
AD-67872.1	A-135962.1	CCUCAGGCUGUCACACAC A	639	A-135963.1	UGUGUGUGACAGCCUGAG G	836	155-173
AD-67873.1	A-135964.1	CACACACCUAGGGAGAUG A	640	A-135965.1	UCAUCUCCUAGGUGUGU G	837	166-184
AD-67874.1	A-135966.1	AGGGAGAUGCUCGCUUU A	641	A-135967.1	UAAACGGGAGCAUCUCCC A	838	175-193

		A			U		
AD-67875.1	A-135968.1	CCGUUUCUGGGAACCUUG A	642	A-135969.1	UCAAGGUUCCAGAAACG G	839	187-205_G19A_as
AD-67876.1	A-135970.1	AACCUUGGCCCGACUCC U	643	A-135971.1	AGGAGUCGGGGCCAAGGU U	840	198-216_as
AD-67877.1	A-135972.1	CGACUCCUGCAAACUUCG A	644	A-135973.1	UCGAAGUUUGCAGGAGUC G	841	209-227_G19A_as
AD-67878.1	A-135974.1	AACUUCGGUAAAUGUGUA A	645	A-135975.1	UUACACAUUUACCGAAGU U	842	220-238_as
AD-67879.1	A-135976.1	UGUGUAACUCGACCCUGC A	646	A-135977.1	UGCAGGGUCGAGUUACAC A	843	232-250_as
AD-67880.1	A-135978.1	ACCCUGCACCGGCUCACU A	647	A-135979.1	UAGUGAGCCGGUGCAGGG U	844	243-261
AD-67881.1	A-135980.1	GCUCACUCUGUUCAGCAG U	648	A-135981.1	ACUGCUGAACAGAGUGAG C	845	254-272_as
AD-67882.1	A-135982.1	UUCAGCAGUGAAACUCUG A	649	A-135983.1	UCAGAGUUUCACUGCUGA A	846	264-282
AD-67883.1	A-135984.1	AAACUCUGCAUCGAUCAC U	650	A-135985.1	AGUGAUCGAUGCAGAGUU U	847	274-292_as
AD-67884.1	A-135986.1	CGAUCACUAAGACUCCU A	651	A-135987.1	UAGGAAGUCUUAGUGAUC G	848	285-303_G19A_as
AD-67885.1	A-135990.1	GAGGUCCCAGCGUGAGUG U	652	A-135991.1	ACACUCACGCUGGGACCU C	849	307-325_as
AD-67886.1	A-135994.1	UUCUGGCAUCUGUCCUUC U	653	A-135995.1	AGAAGGACAGAUGCCAGA A	850	329-347_as
AD-67887.1	A-135996.1	CCUUCUGGCCAGCCUGUG A	654	A-135997.1	UCACAGGCUGGCCAGAAG G	851	342-360_G19A_as

AD-67888.1	A-135998.1	AGCCUGUGGUCUGGCCAA A	655	A-135999.1	UUUGGCCAGACCACAGGC U	852	352-370_G19A_as
AD-67889.1	A-136000.1	GGCCAAGUGAUGUAACCC U	656	A-136001.1	AGGGUUACAUCACUUGGC C	853	364-382_as
AD-67890.1	A-136002.1	UGUAACCCUCCUCUCCAG A	657	A-136003.1	UCUGGAGAGGAGGGUUAC A	854	374-392
AD-67891.1	A-136004.1	UCUCCAGCCUGUGCACAG A	658	A-136005.1	UCUGUGCACAGGCUGGAG A	855	385-403_G19A_as
AD-67892.1	A-136006.1	UGCACAGGCAGCCUGGGA A	659	A-136007.1	UUCCCAGGCUGCCUGUGC A	856	396-414_as
AD-67893.1	A-136008.1	CCUGGGAACAGCUCCAUC A	660	A-136009.1	UGAUGGAGCUGUCCCAG G	857	407-425
AD-67894.1	A-136010.1	UCCAUCCCCACCCUCAG A	661	A-136011.1	UCUGAGGGGUGGGGAUGG A	858	419-437
AD-67895.1	A-136012.1	CCCUCAGCUAUAUUAGG A	662	A-136013.1	UCCUAUUUAUAGCUGAGG G	859	430-448_G19A_as
AD-67896.1	A-136014.1	UAAAUAGGGCAUCGUGAC A	663	A-136015.1	UGUCACGAUGCCCUAUUU A	860	440-458
AD-67897.1	A-136016.1	AUCGUGACCCGGCCGGGG A	664	A-136017.1	UCCCCGGCCGGGUCACGA U	861	450-468_G19A_as
AD-67898.1	A-136018.1	CCGGGGGAAGAAGCUGCC A	665	A-136019.1	UGGCAGCUUCUCCCCCG G	862	462-480_G19A_as
AD-67899.1	A-136020.1	AGCUGCCGUUGUUCUGGG U	666	A-136021.1	ACCCAGAACAACGGCAGC U	863	473-491_as
AD-67900.1	A-136022.1	UUCUGGGUACUACAGCAG A	667	A-136023.1	UCUGCUGUAGUACCCAGA A	864	484-502_as
AD-67901.1	A-136024.1	UACAGCAGAAGGGUAUGC A	668	A-136025.1	UGCAUACCCUUCUGCUGU A	865	494-512_G19A_as

		A			A		
AD-67902.1	A-136026.1	UAUGC GGAAGCGAGCACC A	669	A-136027.1	UGGUGCUCGCUUCCGCAU A	866	507-525
AD-67903.1	A-136028.1	CGAGCACCCCAGUCUGAG A	670	A-136029.1	UCUCAGACUGGGGUGCUC G	867	517-535_as
AD-67904.1	A-136032.1	CUCCUGCCGGUGUGAGCC U	671	A-136033.1	AGGCUCACACCGGCAGGA G	868	539-557_as
AD-67905.1	A-136034.1	UGUGAGCCUGAGGGCCAC A	672	A-136035.1	UGUGGCCUCAGGCUCAC A	869	549-567
AD-67906.1	A-136036.1	GGGCCACCAUCCUCUGCC U	673	A-136037.1	AGGCAGAGGAUGGUGGCC C	870	560-578_as
AD-67907.1	A-136038.1	CUGCCUCCUGGCCUGGGC U	674	A-136039.1	AGCCCAGGCCAGGAGGCA G	871	573-591_as
AD-67908.1	A-136042.1	CCUGGCUGCAGGUGACCG A	675	A-136043.1	UCGGUCACCUGCAGCCAG G	872	594-612_G19A_as
AD-67909.1	A-136044.1	UGACCGGGUGUACAUACA A	676	A-136045.1	UUGUAUGUACACCCGGUC A	873	606-624
AD-67910.1	A-136046.1	UACAUACACCCCUUCCAC A	677	A-136047.1	UGUGGAAGGGGUGUAUGU A	874	616-634
AD-67911.1	A-136048.1	UUCCACCUCGUCAUCCAC A	678	A-136049.1	UGUGGAUGACGAGGUGGA A	875	628-646_as
AD-67912.1	A-136050.1	UCAUCCACAAUGAGAGUA A	679	A-136051.1	UUACUCUCAUUGUGGAUG A	876	638-656
AD-67913.1	A-136056.1	AAAGGCCAAUGCCGGGAA A	680	A-136057.1	UUUCCCGGCAUUGGCCUU U	877	672-690_G19A_as
AD-67914.1	A-136058.1	CCGGGAAGCCCAAAGACC A	681	A-136059.1	UGGUCUUUGGGCUUCCCG G	878	683-701

AD-67915.1	A-136060.1	AAAGACCCCACCUUCAUA A	682	A-136061.1	UUAUGAAGGUGGGGUCUU U	879	694-712
AD-67916.1	A-136062.1	CCUUCAUACCUGCUCCAA U	683	A-136063.1	AUUGGAGCAGGUUAUGAAG G	880	704-722_as
AD-67917.1	A-136064.1	CUCCAAUUCAGGCCAAGA A	684	A-136065.1	UUCUUGGCCUGAAUUGGA G	881	716-734
AD-67918.1	A-136066.1	AGGCCAAGACAUCCCCUG U	685	A-136067.1	ACAGGGGAUGUCUUGGCC U	882	725-743_as
AD-67919.1	A-136068.1	UCCCCUGUGGAUGAAAAG A	686	A-136069.1	UCUUUUCAUCCACAGGGG A	883	736-754_G19A_as
AD-67920.1	A-136070.1	AAAAGGCCCUACAGGACC A	687	A-136071.1	UGGUCCUGUAGGGCCUUU U	884	749-767_as
AD-67921.1	A-136072.1	UACAGGACCAGCUGGUGC U	688	A-136073.1	AGCACCAGCUGGUCCUGU A	885	758-776_as
AD-67922.1	A-136078.1	UUGACACCGAAGACAAGU U	689	A-136079.1	AACUUGUCUUCGGUGUCA A	886	791-809_as
AD-67923.1	A-136080.1	ACAAGUUGAGGGCCGCAA U	690	A-136081.1	AUUGCGGCCCUCAACUUG U	887	803-821_as
AD-67924.1	A-136082.1	GCCGCAAUGGUCGGAUG A	691	A-136083.1	UCAUCCCGACCAUUGCGG C	888	814-832
AD-67925.1	A-136084.1	CGGGAUGCUGGCCAACUU A	692	A-136085.1	UAAGUUGGCCAGCAUCCC G	889	825-843
AD-67926.1	A-136086.1	CAACUUCUUGGGCUUCCG U	693	A-136087.1	ACGGAAGCCCAAGAAGUU G	890	837-855_as
AD-67927.1	A-136088.1	GGCUUCCGUUAUAUAGGC A	694	A-136089.1	UGCCAUUAUACGGAAGC C	891	847-865_as
AD-67928.1	A-136090.1	UAUGGCAUGCACAGUGAG A	695	A-136091.1	UCUCACUGUGCAUGCCAU A	892	859-877

		A			A		
AD-67929.1	A-136092.1	ACAGUGAGCUAUGGGGCG U	696	A-136093.1	ACGCCCAUAGCUCACUG U	893	869-887_as
AD-67930.1	A-136098.1	CGUCCUCUCCCCAACGGC U	697	A-136099.1	AGCCGUUGGGGAGAGGAC G	894	903-921_as
AD-67931.1	A-136102.1	UUUGGCACCCUGGCCUCU A	698	A-136103.1	UAGAGGCCAGGGUGCCAA A	895	925-943
AD-67932.1	A-136104.1	CUGGCCUCUCUCUAUCUG A	699	A-136105.1	UCAGAUAGAGAGAGGCCA G	896	934-952_G19A_as
AD-67933.1	A-136106.1	UAUCUGGGAGCCUUGGAC A	700	A-136107.1	UGUCCAAGGCUCCAGAU A	897	946-964
AD-67934.1	A-136108.1	UUGGACCACACAGCUGAC A	701	A-136109.1	UGUCAGCUGUGUGGUCCA A	898	958-976_as
AD-67935.1	A-136110.1	ACAGCUGACAGGCUACAG A	702	A-136111.1	UCUGUAGCCUGUCAGCUG U	899	967-985_G19A_as
AD-67936.1	A-136112.1	UACAGGCAAUCCUGGGUG U	703	A-136113.1	ACACCCAGGAUUGCCUGU A	900	980-998_as
AD-67937.1	A-136114.1	UCCUGGGUGUUCUUGGA A	704	A-136115.1	UUCCAAGGAACACCCAGG A	901	989-1007_as
AD-67938.1	A-136116.1	UUGGAAGGACAAGAACUG A	705	A-136117.1	UCAGUUCUUGUCCUCCA A	902	1002-1020
AD-67939.1	A-136118.1	AGAACUGCACCUCGGC U	706	A-136119.1	AGCCGGGAGGUGCAGUUC U	903	1013-1031_as
AD-67940.1	A-136122.1	UGCGCACAAGGUCCUGUC U	707	A-136123.1	AGACAGGACCUUGUGCGC A	904	1035-1053_as
AD-67947.1	A-136126.1	CUGCAGGCUGUACAGGGC A	708	A-136127.1	UGCCUGUACAGCCUGCA G	905	1057-1075

AD-67948.1	A-136128.1	UACAGGGCCUGCUAGUGG A	709	A-136129.1	UCCACUAGCAGGCCUGU A	906	1067-1085
AD-67949.1	A-136130.1	UAGUGGCCCCAGGGCAGGG A	710	A-136131.1	UCCCUGCCCUGGGCCACU A	907	1079-1097
AD-67950.1	A-136132.1	AGGGCAGGGCUGAUAGCC A	711	A-136133.1	UGGCUAUCAGCCCUGCCC U	908	1088-1106_as
AD-67951.1	A-136134.1	UAGCCAGGCCCCAGCUGCU A	712	A-136135.1	UAGCAGCUGGGCCUGGCU A	909	1101-1119_G19A_as
AD-67952.1	A-136136.1	AGCUGCUGCUGUCCACGG U	713	A-136137.1	ACCGUGGACAGCAGCAGC U	910	1112-1130_as
AD-67954.1	A-136140.1	UGGGCGUGUUCACAGCCC A	714	A-136141.1	UGGGCUGUGAACACGCC A	911	1133-1151
AD-67955.1	A-136142.1	CACAGCCCCAGGCCUGCA A	715	A-136143.1	UUGCAGGCCUGGGGCGU G	912	1143-1161
AD-67956.1	A-136144.1	CUGCACCUGAAGCAGCCG U	716	A-136145.1	ACGGCUGCUUCAGGUGCA G	913	1156-1174_as
AD-67957.1	A-136146.1	AGCAGCCGUUUGUGCAGG A	717	A-136147.1	UCCUGCACAAACGGCUGC U	914	1166-1184_G19A_as
AD-67958.1	A-136148.1	UGCAGGGCCUGGCUCUCU A	718	A-136149.1	UAGAGAGCCAGGCCUGC A	915	1178-1196_as
AD-67959.1	A-136150.1	UGGCUCUCUAUACCCUG U	719	A-136151.1	ACAGGGUUAUAGAGAGCC A	916	1187-1205_as
AD-67960.1	A-136152.1	ACCCUGUGGUCCUCCCA A	720	A-136153.1	UUGGGAGGACCACAGGGG U	917	1198-1216
AD-67962.1	A-136156.1	CUGGACUUCACAGAACUG A	721	A-136157.1	UCAGUUCUGUGAAGUCCA G	918	1222-1240_G19A_as
AD-67963.1	A-136158.1	AGAACUGGAUGUUGCUGC A	722	A-136159.1	AGCAGCAACAUCCAGUUC A	919	1233-1251_as

		U			U		
AD-67964.1	A-136160.1	UUGCUGCUGAGAAGAUUG A	723	A-136161.1	UCAAUUCUUCUCAGCAGCA A	920	1244-1262_as
AD-67965.1	A-136162.1	AGAAGAUUGACAGGUUCA U	724	A-136163.1	AUGAACCUGUCAUCUUC U	921	1253-1271_as
AD-67966.1	A-136164.1	AGGUUCAUGCAGGCUGUG A	725	A-136165.1	UCACAGCCUGCAUGAACC U	922	1264-1282_as
AD-67967.1	A-136166.1	GCUGUGACAGGAUGGAAG A	726	A-136167.1	UCUCCAUCUGUCACAG C	923	1276-1294_as
AD-67968.1	A-136168.1	UGGAAGACUGGCUGCUCC A	727	A-136169.1	UGGAGCAGCCAGUCUCC A	924	1288-1306
AD-67970.1	A-136172.1	AUGGGAGCCAGUGUGGAC A	728	A-136173.1	UGUCCACACUGGCUCCA U	925	1309-1327_as
AD-67971.1	A-136174.1	UGUGGACAGCACCCUGGC U	729	A-136175.1	AGCCAGGGUGCUGUCCAC A	926	1320-1338_as
AD-67972.1	A-136176.1	CCUGGCUUCAACACCUA A	730	A-136177.1	UUAGGUGUUGAAAGCCAG G	927	1332-1350
AD-67973.1	A-136178.1	CAACACCUACGUCCACUU A	731	A-136179.1	UAAGUGGACGUAGGUGUU G	928	1341-1359
AD-67974.1	A-136180.1	CACUCCAAGGGAAGAUG A	732	A-136181.1	UCAUCUCCCUUGGAAGU G	929	1354-1372_as
AD-67975.1	A-136182.1	GGAAGAUGAAGGGCUUC U	733	A-136183.1	AGAAGCCCUUCAUCUCC C	930	1363-1381_as
AD-67976.1	A-136184.1	GCUUCUCCUGCUGGCCG A	734	A-136185.1	UCGGCCAGCAGGGAGAAG C	931	1376-1394_as
AD-67978.1	A-136188.1	CCAGGAGUUCUGGGUGGA A	735	A-136189.1	UUCCACCCAGAACUCCUG G	932	1398-1416

AD-67979.1	A-136190.1	UGGGUGGACAACAGCACC U	736	A-136191.1	AGGUGCUGUUGUCCACCC A	933	1408-1426_as
AD-67980.1	A-136192.1	ACAGCACCUCAGUGUCUG U	737	A-136193.1	ACAGACACUGAGGUGCUG U	934	1418-1436_as
AD-67981.1	A-136194.1	UGUCUGUUCCCAUGCUCU A	738	A-136195.1	UAGAGCAUGGGAACAGAC A	935	1430-1448
AD-67982.1	A-136196.1	CAUGCUCUCUGGCAUGGG A	739	A-136197.1	UCCCAUGCCAGAGAGCAU G	936	1440-1458
AD-67983.1	A-136198.1	AUGGGCACCUUCCAGCAC U	740	A-136199.1	AGUGCUGGAAGGUGCCCA U	937	1453-1471_as
AD-67984.1	A-136200.1	UUC CAGCACUGGAGUGAC A	741	A-136201.1	UGUCACUCCAGUGCUGGA A	938	1462-1480_as
AD-67986.1	A-136204.1	AGGACAACUUCUCGGUGA A	742	A-136205.1	UUCACCGAGAAGUUGUCC U	939	1484-1502
AD-67987.1	A-136206.1	UCGGUGACUCAAGUGCCC U	743	A-136207.1	AGGGCACUUGAGUCACCG A	940	1495-1513_as
AD-67988.1	A-136208.1	UGCCCUUCACUGAGAGCG A	744	A-136209.1	UCGCUCUCAGUGAAGGGC A	941	1508-1526
AD-67989.1	A-136210.1	UGAGAGCGCCUGCCUGCU A	745	A-136211.1	UAGCAGGCAGGCGCUCUC A	942	1518-1536_G19A_as
AD-67990.1	A-136212.1	CCUGCUGCUGAUCCAGCC U	746	A-136213.1	AGGCUGGAUCAGCAGCAG G	943	1530-1548_as
AD-67991.1	A-136214.1	AUCCAGCCUCACUAUGCC U	747	A-136215.1	AGGCAUAGUGAGGCUGGA U	944	1540-1558_as
AD-67992.1	A-136216.1	UAUGCCUCUGACCUGGAC A	748	A-136217.1	UGUCCAGGUCAGAGGCAU A	945	1552-1570_as
AD-67993.1	A-136218.1	ACCUGGACAAGGUGGAGG A	749	A-136219.1	UCCUCCACCUUGUCCAGG A	946	1562-1580_G19A_as

		A			U		
AD-67994.1	A-136220.1	UGGAGGGUCUCACUUUCC A	750	A-136221.1	UGGAAAGUGAGACCCUCC A	947	1574-1592_as
AD-67995.1	A-136222.1	CACUUUCCAGCAAAACUC A	751	A-136223.1	UGAGUUUUGCUGGAAAGU G	948	1584-1602
AD-67996.1	A-136224.1	AAAACUCCCUCAACUGGA U	752	A-136225.1	AUCCAGUUGAGGGAGUUU U	949	1595-1613_as
AD-67997.1	A-136226.1	AACUGGAUGAAGAAACUA U	753	A-136227.1	AUAGUUUCUUAUCCAGU U	950	1606-1624_as
AD-67998.1	A-136228.1	AAACUAUCUCCCCGACC A	754	A-136229.1	UGGUCCGGGGAGAUAGUU U	951	1618-1636_as
AD-67999.1	A-136230.1	CCGGACCAUCCACCUGAC A	755	A-136231.1	UGUCAGGUGGAUGGUCCG G	952	1629-1647
AD-68001.1	A-136234.1	UGCCCCAACUGGUGCUGC A	756	A-136235.1	UGCAGCACCAGUUGGGGC A	953	1649-1667_as
AD-68002.1	A-136236.1	UGCUGCAAGGAUCUUAUG A	757	A-136237.1	UCAUAAGAUCUUGCAGC A	954	1661-1679_as
AD-68003.1	A-136238.1	UCUUAUGACCUGCAGGAC A	758	A-136239.1	UGUCCUGCAGGUCAUAAG A	955	1672-1690
AD-68004.1	A-136240.1	UGCAGGACCUGCUCGCC A	759	A-136241.1	UGGGCGAGCAGGUCCUGC A	956	1682-1700_as
AD-68005.1	A-136242.1	UCGCCCAGGCUGAGCUGC A	760	A-136243.1	UGCAGCUCAGCCUGGGCG A	957	1694-1712
AD-68006.1	A-136244.1	UGAGCUGCCCGCCAUUCU A	761	A-136245.1	UAGAAUGGCGGGCAGCUC A	958	1704-1722_G19A_as
AD-68009.1	A-136250.1	UGCAAAAUUGAGCAAUG A	762	A-136251.1	UCAUUGCUCAAUUUUUGC A	959	1739-1757_as

AD-68010.1	A-136252.1	AGCAAUGACCGCAUCAGG A	763	A-136253.1	UCCUGAUGCGGUCAUUGC U	960	1750-1768_G19A_as
AD-68011.1	A-136254.1	CAUCAGGGUGGGGGAGGU A	764	A-136255.1	UACCUCCCCCACCCUGAU G	961	1761-1779_G19A_as
AD-68012.1	A-136256.1	GGGGAGGUGCUGAACAGC A	765	A-136257.1	UGCUGUUCAGCACCUCCC C	962	1771-1789_as
AD-68013.1	A-136258.1	AACAGCAUUUUUUUUGAG A	766	A-136259.1	UCUCAAAAAAAAAUGCUGU U	963	1783-1801
AD-68014.1	A-136260.1	UUUUUGAGCUUGAAGCGG A	767	A-136261.1	UCCGCUUCAAGCUCAAAA A	964	1793-1811_as
AD-68017.1	A-136266.1	AGAGUCUACCCAACAGCU U	768	A-136267.1	AAGCUGUUGGGUAGACUC U	965	1827-1845_as
AD-68018.1	A-136268.1	CAACAGCUUAACAAGCCU A	769	A-136269.1	UAGGCUUGUUAAGCUGUU G	966	1837-1855_G19A_as
AD-68019.1	A-136270.1	CAAGCCUGAGGUCUUGGA A	770	A-136271.1	UUCCAAGACCUCAGGCUU G	967	1848-1866_G19A_as
AD-68020.1	A-136272.1	CUUGGAGGUGACCCUGAA A	771	A-136273.1	UUUCAGGGUCACCUCCAA G	968	1860-1878
AD-68021.1	A-136274.1	ACCCUGAACCGCCCAUUC A	772	A-136275.1	UGAAUGGGCGGUUCAGGG U	969	1870-1888
AD-68022.1	A-136276.1	GCCCAUCCUGUUUGCUG U	773	A-136277.1	ACAGCAAACAGGAAUGGG C	970	1880-1898_as
AD-68025.1	A-136284.1	CACUCCUGGGCCGCGUG A	774	A-136285.1	UCACGCGGCCAGGAAGU G	971	1924-1942_G19A_as
AD-68026.1	A-136286.1	CGCGUGGCCAACCCGCUG A	775	A-136287.1	UCAGCGGGUUGGCCACGC G	972	1936-1954_as
AD-68027.1	A-136288.1	ACCCGCUGAGCACAGCAU A	776	A-136289.1	UAUGCUGUGCUCAGCGGG G	973	1946-1964_G19A_as

		A			U		
AD-68028.1	A-136290.1	ACAGCAUGAGGCCAGGGC A	777	A-136291.1	UGCCCUGGCCUCAUGCUG U	974	1957-1975
AD-68029.1	A-136292.1	CAGGGCCCCAGAACACAG U	778	A-136293.1	ACUGUGUUCUGGGGCCCU G	975	1969-1987_as
AD-68032.1	A-136298.1	UCUGCCCCUGGCCUUUGA A	779	A-136299.1	UUCAAGGCCAGGGGCAG A	976	2001-2019_G19A_as
AD-68033.1	A-136300.1	UUUGAGGCAAAGGCCAGC A	780	A-136301.1	UGCUGGCCUUUGCCUCA A	977	2014-2032_as
AD-68034.1	A-136302.1	AGGCCAGCAGCAGAUAAC A	781	A-136303.1	UGUUAUCUGCUGCUGGCC U	978	2024-2042_as
AD-68035.1	A-136304.1	AGAUAAACAACCCCGGACA A	782	A-136305.1	UUGUCCGGGUUGUUAUC U	979	2035-2053_as
AD-68036.1	A-136306.1	CCGGACAAAUCAGCGAUG U	783	A-136307.1	ACAUCGCUGAUUUGUCCG G	980	2046-2064_as
AD-68037.1	A-136308.1	AGCGAUGUGUCACCCCA A	784	A-136309.1	UUGGGGGUGACACAUCGC U	981	2057-2075_G19A_as
AD-68084.2	A-136314.1	UUCUAAUGAGUCGACUUU A	785	A-136315.1	UAAAGUCGACUCAUUGA A	982	2090-2108_G19A_as
AD-68085.2	A-136320.1	GUUUCUCCUUGGUCUAAG U	786	A-136321.1	ACUUAGACCAAGGAGAAA C	983	2124-2142_as
AD-68086.2	A-136328.1	AGCCUGCAGCGGCACAAA U	787	A-136329.1	AUUUGGCCGCUGCAGGC U	984	2167-2185_as
AD-68087.2	A-136330.1	CACAAUGCACCUCCAG U	788	A-136331.1	ACUGGGAGGUGCAUUUGU G	985	2179-2197_as
AD-68088.2	A-136332.1	ACCUCCAGUUUGCUGGG U	789	A-136333.1	ACCCAGCAAACUGGGAGG U	986	2188-2206_as

AD-68089.2	A-136334.1	UGCUGGGUUUUAUUUAGA A	790	A-136335.1	UUCUAAAAUAAACCCAGC A	987	2199-2217_G19A_as
AD-68090.2	A-136340.1	CAAGAACCAGUGUUUAGC A	791	A-136341.1	UGCUAAACACUGGUUCUU G	988	2234-2252_G19A_as
AD-68091.2	A-136354.1	AGUGUCCCCUUUCAAGU U	792	A-136355.1	AACUUGAAAAGGGAACAC U	989	2309-2327_as
AD-68092.2	A-136356.1	UUCAAGUUGAGAACAAAA A	793	A-136357.1	UUUUUGUUCUCAACUUGA A	990	2320-2338_as
AD-68093.2	A-136358.1	CAAAAAUUGGGUUUUAAA A	794	A-136359.1	UUUUAAAACCCAAUUUUU G	991	2333-2351_as
AD-68094.2	A-136362.1	AAAGUAUACAUUUUUGCA U	795	A-136363.1	AUGC AAAAUGUAUACUU U	992	2354-2372_as
AD-68095.2	A-136368.1	UUUAGUGUCUUGAAUGUA A	796	A-136369.1	UUACAUUCAAGACACUAA A	993	2388-2406_as
AD-68096.2	A-136370.1	GAAUGUAAGAACAUGACC U	797	A-136371.1	AGGUCAUGUUCUUACAUU C	994	2399-2417_as
AD-68097.2	A-136374.1	UGUAGUGUCUGUAAUACC U	798	A-136375.1	AGGUUUACAGACACUAC A	995	2421-2439_as
AD-68098.2	A-136376.1	UGUAAUACCUUAGUUUUU U	799	A-136377.1	AAAAACUAAGGUUUUAC A	996	2430-2448_as
AD-68099.2	A-136378.1	UUUUUCCACAGAUGCUU A	800	A-136379.1	UAAGCAUCUGUGGAAAA A	997	2443-2461_G19A_as
AD-68100.2	A-136382.1	UUUUUGAACAAUACGUGA A	801	A-136383.1	UUCACGUUUUGUUCAAAA A	998	2465-2483_as
AD-68101.2	A-136392.1	ACCAUAGCUGGUUUUUUC U	802	A-136393.1	AGAAUAACCAGCUAUGG U	999	2519-2537_as
AD-68102.2	A-136394.1	UUUUUUCUCCCUUGUGUU U	803	A-136395.1	UAACACAAGGGAGAAUA U	1000	2530-2548_as

		A			A		
AD-68116.1	A-136312.1	UCCCACCUUUUCUUCUAA U	804	A-136313.1	AUUAGAAGAAAAGGUGGG A	1001	2078-2096_as
AD-68117.1	A-136316.1	UCGACUUUGAGCUGGAAA G	805	A-136317.1	CUUUCAGCUCAAAGUCG A	1002	2100-2118_as
AD-68118.1	A-136318.1	CUGGAAAGCAGCCGUUUC U	806	A-136319.1	AGAAACGGCUGCUUUCCA G	1003	2111-2129_as
AD-68119.1	A-136322.1	UGGUCUAAGUGUGCUGCA U	807	A-136323.1	AUGCAGCACACUUAGACC A	1004	2133-2151_as
AD-68120.1	A-136324.1	GCUGCAUGGAGUGAGCAG U	808	A-136325.1	ACUGCUCACUCCAUGCAG C	1005	2145-2163_as
AD-68121.1	A-136326.1	UGAGCAGUAGAAGCCUGC A	809	A-136327.1	UGCAGGCUUCUACUGCUC A	1006	2156-2174_as
AD-68122.1	A-136336.1	UUAGAGAAUGGGGGUGGG A	810	A-136337.1	UCCCACCCCAUUCUCUA A	1007	2212-2230_G19A_as
AD-68123.1	A-136338.1	GGGUGGGGAGGCAAGAAC A	811	A-136339.1	UGUUCUUGCCUCCCCACC C	1008	2223-2241
AD-68124.1	A-136342.1	UGUUUAGCGCGGGACUAC U	812	A-136343.1	AGUAGUCCCGCGCUAAAC A	1009	2244-2262_as
AD-68125.1	A-136344.1	GGACUACUGUCCAAAAA G	813	A-136345.1	CUUUUUGGAACAGUAGUC C	1010	2255-2273_as
AD-68126.1	A-136350.1	AGCUUGUUUGUGAAACAA A	814	A-136351.1	UUUGUUUCACAAACAAGC U	1011	2288-2306_as
AD-68127.1	A-136352.1	AAACAAAAAAGUGUCC U	815	A-136353.1	AGGGAACACUUUUUGUU U	1012	2300-2318_as
AD-68128.1	A-136360.1	UUUUAAAAUUAAAGUAUA A	816	A-136361.1	UUAUACUUUUUUUUAAA A	1013	2344-2362

AD-68129.1	A-136364.1	UUUUGCAUUGCCUUCGGU U	817	A-136365.1	AACCGAAGGCAAUGCAAA A	1014	2365-2383_as
AD-68130.1	A-136366.1	UUCGGUUUGUAUUUAGUG U	818	A-136367.1	ACACUAAAUACAAACCGA A	1015	2377-2395_as
AD-68131.1	A-136372.1	AACAUGACCUCGUGUAG U	819	A-136373.1	ACUACACGGAGGUCAUGU U	1016	2408-2426_as
AD-68132.1	A-136380.1	CAGAUGCUUGUGAUUUUU A	820	A-136381.1	UAAAAAUCACAAGCAUCU G	1017	2452-2470_G19A_as
AD-68133.1	A-136384.1	UACGUGAAAGAUGCAAGC A	821	A-136385.1	UGCUUGCAUCUUUCACGU A	1018	2476-2494_as
AD-68134.1	A-136386.1	UGCAAGCACCUGAAUUUC U	822	A-136387.1	AGAAAUUCAGGUGCUUGC A	1019	2487-2505_as
AD-68135.1	A-136388.1	GAAUUUCUGUUUGAAUGC A	823	A-136389.1	UGCAUUCAAACAGAAAUU C	1020	2498-2516_G19A_as
AD-68136.1	A-136390.1	UUUGAAUGCGGAACCAUA A	824	A-136391.1	UUAUGGUUCCGCAUUCAA A	1021	2507-2525_G19A_as
AD-68137.1	A-136396.1	UUGUGUUAGUAAUAAACG U	825	A-136397.1	ACGUUUUUACUACACA A	1022	2541-2559_as
AD-68138.1	A-136398.1	AUAAACGUCUUGCCACAA U	826	A-136399.1	AUUGUGGCAAGACGUUUA U	1023	2552-2570_as
AD-68139.1	A-136400.1	UGCCACAAUAAGCCUCCA A	827	A-136401.1	UUGGAGGCUUAUUGUGGC A	1024	2562-2580_as

Таблица 12. Скрининг однократных доз АГТ в клетках Нер3В
(21/23-членные олигомеры)

Название дуплекса	10 нМ средн.	10 нМ SD	0,1 нМ средн.	0,1 нМ SD
AD-67864.1	86,08	0,42	100,66	4,93
AD-67865.1	90,98	0,44	97,56	4,30
AD-67866.1	107,85	3,17	108,20	1,59
AD-67867.1	96,24	5,18	96,22	4,24
AD-67868.1	92,25	0,45	93,87	0,92
AD-67869.1	107,24	8,40	96,54	3,78
AD-67870.1	89,43	1,75	96,84	0,47
AD-67871.1	100,66	4,93	96,91	5,22
AD-67872.1	92,27	2,26	87,75	7,73
AD-67873.1	118,49	6,38	105,63	3,10
AD-67874.1	98,36	8,18	99,57	1,46
AD-67875.1	98,55	2,89	100,76	14,27
AD-67876.1	98,951	5,33	105,24	0,51
AD-67877.1	104,94	5,14	100,97	2,47
AD-67878.1	101,79	7,47	100,61	0,98
AD-67879.1	99,66	6,34	101,66	0,49
AD-67880.1	99,23	1,94	93,79	9,63
AD-67881.1	95,84	0,93	104,16	2,04
AD-67882.1	97,52	1,43	98,09	9,60
AD-67883.1	94,53	1,85	95,88	3,75
AD-67884.1	110,16	5,39	105,25	1,54
AD-67885.1	101,70	4,48	97,94	5,75
AD-67886.1	107,09	2,09	102,03	3,00
AD-67887.1	95,51	0,46	94,24	4,15
AD-67888.1	105,98	1,55	101,03	5,44
AD-67889.1	89,42	0,87	102,44	5,52
AD-67890.1	96,51	0,94	99,34	6,81
AD-67891.1	89,73	0,43	102,01	0,99
AD-67892.1	85,81	3,36	91,97	3,60
AD-67893.1	104,89	2,05	93,25	3,65
AD-67894.1	95,95	6,57	100,61	0,98
AD-67895.1	87,61	3,43	92,99	5,92
AD-67896.1	102,36	0,50	102,37	1,50
AD-67897.1	89,23	6,55	101,66	1,49
AD-67898.1	87,68	6,01	97,89	3,83
AD-67899.1	10,98	1,28	28,08	7,87
AD-67900.1	16,91	2,47	42,49	5,81
AD-67901.1	51,36	1,00	73,53	10,77

AD-67902.1	32,91	6,25	49,54	4,60
AD-67903.1	8,23	3,73	25,89	8,71
AD-67904.1	76,02	3,35	92,35	5,88
AD-67905.1	99,22	0,97	103,21	7,58
AD-67906.1	12,68	6,52	31,29	0,76
AD-67907.1	25,24	0,86	68,71	0,67
AD-67908.1	15,32	6,82	41,71	0,40
AD-67909.1	57,21	2,52	81,72	1,60
AD-67910.1	11,66	3,10	54,68	6,68
AD-67911.1	40,57	0,39	60,72	4,16
AD-67912.1	21,45	0,84	50,16	2,70
AD-67913.1	44,86	5,26	69,55	5,78
AD-67914.1	13,41	4,82	14,58	2,84
AD-67915.1	38,73	3,41	62,81	7,67
AD-67916.1	5,21	2,70	19,28	6,84
AD-67917.1	16,92	1,57	50,03	3,91
AD-67918.1	52,71	4,38	95,29	6,53
AD-67919.1	86,98	0,85	96,94	6,17
AD-67920.1	28,31	8,20	62,46	8,84
AD-67921.1	40,44	1,38	65,06	20,38
AD-67922.1	37,99	0,93	68,09	5,00
AD-67923.1	9,52	0,97	31,95	1,09
AD-67924.1	20,28	2,28	53,38	6,78
AD-67925.1	15,78	1,46	35,24	4,82
AD-67926.1	12,85	0,88	28,20	0,41
AD-67927.1	39,78	2,72	70,72	17,16
AD-67928.1	48,92	8,11	76,56	4,12
AD-67929.1	95,53	3,27	103,52	6,08
AD-67930.1	7,70	3,25	38,13	1,12
AD-67931.1	62,59	2,14	83,32	7,74
AD-67932.1	12,85	4,97	48,21	4,95
AD-67933.1	75,51	4,06	99,92	1,95
AD-67934.1	95,55	4,21	95,85	1,87
AD-67935.1	6,92	0,06	26,43	22,43
AD-67936.1	30,62	3,29	64,66	5,06
AD-67937.1	11,89	1,33	46,23	25,91
AD-67938.1	84,08	4,94	94,19	0,46
AD-67939.1	49,09	0,24	76,31	13,39
AD-67940.1	77,85	0,76	90,12	5,29
AD-67947.1	81,74	5,60	89,68	3,07
AD-67948.1	57,40	3,93	75,94	12,96

AD-67949.1	89,04	1,30	98,84	4,35
AD-67950.1	30,38	6,93	50,01	4,40
AD-67951.1	57,60	12,32	84,26	2,89
AD-67952.1	30,08	9,84	71,83	1,76
AD-67954.1	63,41	2,17	83,16	5,29
AD-67955.1	66,78	1,30	88,74	2,60
AD-67956.1	48,82	4,54	84,38	7,02
AD-67957.1	66,79	1,96	96,46	3,78
AD-67958.1	11,88	6,31	28,49	7,58
AD-67959.1	50,08	5,87	78,05	1,14
AD-67960.1	53,33	9,104	72,41	9,90
AD-67962.1	17,29	5,41	54,30	13,17
AD-67963.1	19,63	2,11	49,27	15,43
AD-67964.1	14,83	0,14	46,79	6,40
AD-67965.1	15,94	9,26	36,16	16,09
AD-67966.1	41,84	9,95	80,28	3,54
AD-67967.1	20,10	2,94	45,85	6,71
AD-67968.1	24,10	0,47	45,77	0,22
AD-67970.1	41,61	6,09	59,36	1,16
AD-67971.1	92,20	3,16	97,48	4,29
AD-67972.1	24,48	3,46	60,84	2,68
AD-67973.1	67,49	2,31	93,19	4,56
AD-67974.1	22,421	0,76	62,87	17,33
AD-67975.1	20,05	2,157	52,74	5,93
AD-67976.1	19,21	5,30	54,84	6,96
AD-67978.1	17,36	1,10	60,49	14,96
AD-67979.1	104,18	7,14	104,08	3,06
AD-67980.1	17,85	4,84	43,65	9,34
AD-67981.1	28,91	4,09	63,61	0,62
AD-67982.1	91,54	0,44	103,34	
AD-67983.1	76,45	1,87	97,09	0,95
AD-67984.1	23,20	0,34	75,39	8,84
AD-67986.1	10,16	2,32	43,00	0,21
AD-67987.1	82,21	0,80	90,90	10,66
AD-67988.1	22,56	7,80	59,12	9,52
AD-67989.1	34,16	10,22	67,14	9,83
AD-67990.1	24,33	3,68	36,35	3,20
AD-67991.1	81,13	3,97	100,55	3,94
AD-67992.1	56,20	3,30	97,78	1,91
AD-67993.1	29,38	5,01	78,86	13,08
AD-67994.1	20,30	4,44	30,93	

AD-67995.1	13,97	2,72	37,27	5,82
AD-67996.1	14,48	0,49	30,62	6,25
AD-67997.1	35,60	7,78	70,86	12,09
AD-67998.1	29,38	5,01	62,37	15,13
AD-67999.1	58,52	6,58	86,27	9,70
AD-68001.1	39,90	11,75	68,76	5,38
AD-68002.1	70,36	2,41	87,50	1,61
AD-68003.1	31,65	2,78	86,01	2,10
AD-68004.1	23,47	1,60	42,71	1,04
AD-68005.1	30,41	6,21	68,42	1,00
AD-68006.1	20,44	8,64	41,45	5,87
AD-68009.1	26,59	6,45	50,87	12,58
AD-68010.1	18,01	2,98	41,65	11,68
AD-68011.1	48,64	4,28	75,01	10,99
AD-68012.1	21,28	0,41	66,82	13,98
AD-68013.1	101,46	9,93	109,28	4,28
AD-68014.1	43,62	7,44	71,82	0,35
AD-68017.1	16,05	11,61	38,14	14,23
AD-68018.1	14,74	0,57	62,02	9,38
AD-68019.1	20,85	3,66	84,24	1,23
AD-68020.1	31,12	4,86	70,58	16,45
AD-68021.1	18,98	3,8	56,30	10,96
AD-68022.1	16,41	9,93	27,87	15,96
AD-68025.1	86,91	1,70	99,51	3,41
AD-68026.1	26,43	9,50	73,34	1,79
AD-68027.1	39,43	0,38	72,57	1,42
AD-68028.1	56,98	3,34	80,52	
AD-68029.1	49,97	3,42	85,43	2,93
AD-68032.1	71,12	3,48	91,96	6,30
AD-68033.1	102,29	2,50	99,13	0,97
AD-68034.1	15,54	3,32	32,03	3,91
AD-68035.1	19,40	6,88	49,77	6,32
AD-68036.1	16,23	8,62	29,22	4,28
AD-68037.1	20,40	5,24	49,31	9,13
AD-68084.2	15,14	3,24	42,67	5,63
AD-68085.2	17,11	5,52	30,76	11,20
AD-68086.2	8,96	0	21,05	2,98
AD-68087.2	22,54	14,44	26,79	37,89
AD-68088.2	34,54	2,19	76,58	1,87
AD-68089.2	27,02	5,91	59,45	13,85
AD-68090.2	19,90	0,97	35,94	7,00

AD-68091.2	15,18	0,74	32,19	3,77
AD-68092.2	13,21	0,25	40,48	1,38
AD-68093.2	13,94	3,11	52,91	25,17
AD-68094.2	48,22	7,06	89,18	25,43
AD-68095.2	83,02	5,69	81,51	1,19
AD-68096.2	74,34	5,82	75,78	1,21
AD-68097.2	88,32	4,32	86,30	7,18
AD-68098.2	69,49	0,34	69,49	1,02
AD-68099.2	95,96	3,76	51,05	72,19
AD-68100.2	81,51	1,19	92,05	3,60
AD-68101.2	76,34	2,99	74,83	5,13
AD-68102.2	71,02	4,52	76,99	6,78
AD-68116.1	9,94	0,38	31,41	3,53
AD-68117.1	18,24	0,62	51,01	7,96
AD-68118.1	16,61	0,32	31,54	7,50
AD-68119.1	48,03	3,76	77,61	12,49
AD-68120.1	20,17	11,80	72,58	10,63
AD-68121.1	16,25	4,55	57,64	25,65
AD-68122.1	57,36	5,33	97,32	4,76
AD-68123.1	15,84	1,24	45,55	2,00
AD-68124.1	24,62	8,40	51,57	19,72
AD-68125.1	18,71	9,38	35,98	6,14
AD-68126.1	13,13	6,42	47,97	1,41
AD-68127.1	41,04	12,66	85,58	2,93
AD-68128.1	62,20	16,27	107,38	9,46
AD-68129.1	79,00		81,25	3,18
AD-68130.1	72,97	2,50	88,00	3,88
AD-68131.1	134,88	9,24	92,09	5,41
AD-68132.1	81,05	5,95	89,85	3,96
AD-68133.1	85,28	2,50	104,25	2,04
AD-68134.1	62,63	0,92	83,94	6,98
AD-68135.1	72,95	0,35	79,05	3,87
AD-68136.1	74,86	10,60	88,88	
AD-68137.1	85,08	6,24	90,50	4,87
AD-68138.1	76,05	1,11	76,34	2,99
AD-68139.1	102,25	8,01	99,42	6,81

Пример 4: Выключение гена AGT *in vivo* у мыши, экспрессирующей hAGT

Осуществляли серию экспериментов для того, чтобы оценивать нокдаун мишени hAGT у мышей, экспрессирующих AGT человека (hAGT) с AAV8 экспрессирующего вектора, который имеет сильный тропизм к

печени. В кратком изложении, мышей инфицировали с использованием 1×10^{11} AAV8 частиц, содержащих экспрессионную конструкцию для hAGT под управлением конститутивного промотора. Через две недели после инфекции мышам вводили одну дозу мiРНК 3,0 мг/кг, 1,0 мг/кг, 0,3 мг/кг или 0,1 мг/кг, которая направлена на hAGT (AD-67327.2 или AD-67335.2), или PBS в качестве контроля (n=4 на группу). Нуклеотидные последовательности средств, которые оценивали в этих экспериментах, представлены в таблице 13.

Таблица 13. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей дцРНК AGT (21/23-членные олигомеры)

Название дуплекса	Местоположение на NM_000029.3	Смысловая цепь/антисмысловая цепь	Смысловая последовательность/антисмысловая последовательность	SEQ ID №	Родительский дуплекс
AD-67327	2081-2101	A-134527	uscsucccAfcCfUfUfuucuucuaauL96	1025	AD-60784
	2079-2101	A-134528	asUfsuagAfagaaaagGfuGfggagascsu	1026	
AD-67335	1894-1914	A-134536	usgsuuugCfuGfUfGfuaugaucaaaaL96	1027	AD-60781
	1892-1914	A-134538	usUfsugaUfcAfUfacacAfgCfaaacasgsg	1028	

В сутки 0, 3, 7 и 14 после введения средств, брали образцы крови и получали сыворотку для того, чтобы определять уровень экспрессии мРНК hAGT относительно уровня hAGT в крови, взятой до введения средств. Результаты этих экспериментов приведены в таблице 14.

Таблица 14. Дозозависимый скрининг однократных доз hAGT у мышей, экспрессирующих hAGT

Дуплекс	Доза, мг/кг	Сутки 0		Сутки 3		Сутки 7		Сутки 14	
		Средн	SD	Средн	SD	Средн	SD	Средн	SD
		
	PBS	1,00	0,00	1,29	0,28	0,91	0,17	0,65	0,05
AD-67327	3	1,00	0,00	0,42	0,09	0,16	0,04	0,11	0,04
	1	1,00	0,00	0,63	0,05	0,44	0,04	0,31	0,06
	0,3	1,00	0,00	1,04	0,13	0,90	0,12	0,77	0,06

	0,1	1,00	0,00	0,91	0,06	0,88	0,07	0,74	0,15
AD- 67335	3	1,00	0,00	0,58	0,14	0,42	0,13	0,37	0,10
	1	1,00	0,00	0,59	0,41	0,64	0,03	0,56	0,12
	0,3	1,00	0,00	1,06	0,28	0,81	0,14	0,80	0,07
	0,1	1,00	0,00	1,18	0,18	1,02	0,10	0,85	0,08

Пример 5: выключение гена AGT *in vivo* у мыши, экспрессирующей hAGT

Осуществляли серию экспериментов для того, чтобы оценивать нокдаун мишени hAGT у мышей, экспрессирующих hAGT с AAV8 экспрессирующего вектора, который имеет сильный тропизм к печени. В кратком изложении, мышей инфицировали с использованием 1×10^{11} AAV8 частиц, содержащих экспрессионную конструкцию для hAGT под управлением конститутивного промотора. Через две недели после инфекции AAV8 вирусом мышам вводили одну дозу миРНК 1 мг/кг, которая направлена на hAGT, или PBS в качестве контроля (n=3 на группу). Нуклеотидные последовательности дуплексов, которые оценивали в этих экспериментах, представлены в таблице 15.

Таблица 15. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей AGT дцРНК (21/23-членные олигомеры)

Название дуплекса	Местоположение на NM_000029.3	Смысловая цепь/ антисмысловая цепь	Смысловая последовательность/ антисмысловая последовательность	SEQ ID №	Родительский дуплекс
AD-68577	855-875	A-137778	ususccguAfuAfUfAfug gcaugcaal96	1029	AD-60779
	853-875	A-137779	usUfsgcaUfgCfCfauau AfuAfcggaasgsc	1030	
AD-68581	1741-1761	A-137784	ascscugcAfaAfAfAfuu gagcaauaL96	1031	AD-56029
	1739-1761	A-137785	usAfsuugCfuCfAfauuu UfuGfcaggususc	1032	
AD-68582	1741-1761	A-137784	ascscugcAfaAfAfAfuu gagcaauaL96	1033	AD-56029
	1739-1761	A-137786	usAfsuugCfucauuuuUf uGfcaggususc	1034	
AD-67335	1894-1914	A-134536	usgsuuugCfuGfUfGfua ugaucaaaL96	1035	AD-60781
	1892-1914	A-134538	usUfsugaUfcAfUfacac	1036	

			AfgCfaaacasgsg		
AD-67327	2081-2101	A-134527	uscsucccAfcCfUfUfuu cuucuaauL96	1037	AD-52474
	2079-2101	A-134528	asUfsuagAfagaaaagGf uGfggagascsu	1038	
AD-68575	2084-2104	A-137775	cscscaccUfuUfUfCfu cuaaugaaL96	1039	AD-60777
	2082-2104	A-137776	usUfscAUfaGfAfagaa AfaGfgugggsasg	1040	
AD-68576	2084-2104	A-137775	cscscaccUfuUfUfCfu cuaaugaaL96	1041	AD-60777
	2082-2104	A-137777	usUfscAUfagaagaaAf aGfgugggsasg	1042	
AD-68583	2291-2311	A-137787	cscsagcuUfgUfUfUfgu gaaacaaaL96	1043	AD-56019
	2289-2311	A-137788	usUfsuguUfuCfAfcaaa CfaAfgcuggsus	1044	
AD-68584	2291-2311	A-137787	cscsagcuUfgUfUfUfgu gaaacaaaL96	1045	AD-56019
	2289-2311	A-137789	usUfsuguUfucacaaaCf aAfgcuggsus	1046	
AD-67313	2309-2329	A-134509	asasaaaaGfuGfUfUfcc cuuuucaaL96	1047	AD-60776
	2307-2329	A-134510	usUfsgaaAfagggaaCf cUfuuuuusgsu	1048	
AD-67314	2309-2329	A-134509	asasaaaaGfuGfUfUfcc cuuuucaaL96	1049	AD-60776
	2307-2329	A-134511	usUfsgaaAfaGfGfgaac AfcUfuuuuusgsu	1050	

Через 7 суток после введения средств брали образцы крови и получали сыворотку для того, чтобы определять уровень экспрессии мРНК hAGT относительно уровня hAGT в крови, взятой до введения средств. Результаты этих экспериментов представлены в таблице 16.

Таблица 16. Дозозависимый скрининг однократных доз hAGT у мышей, экспрессирующих hAGT

Дуплекс	Среднее	SD
PBS	98,6	8,7
AD-68577	65,1	7,7
AD-68581	53,1	3,3

AD-68582	44,8	11,1
AD-67335	60,5	3,1
AD-67327	43,0	1,0
AD-68575	48,0	9,4
AD-68576	47,4	5,9
AD-68583	51,3	7,7
AD-68584	61,0	2,1
AD-67313	70,8	7,6
AD-67314	66,2	5,7

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Специалисты в данной области поймут или будут способны установить, используя не больше чем рутинные эксперименты, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления и способов, описанных в настоящем документе. Такие эквиваленты предназначены для включения в объем следующей формулы изобретения.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль для ингибирования экспрессии ангиотензиногена (AGT) в клетке,

где указанное средство из двухцепочечной РНКи или его соль содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, формирующие двухцепочечную область,

где указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 19 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности 5'-UCAUCCACAAUGAGAGUAA-3' (SEQ ID NO: 679), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности 5'-UUACUCUCAUUGUGGAUGA-3' (SEQ ID NO:876),

где все нуклеотиды указанной смысловой цепи и все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи включают нуклеотидную модификацию, и

где по меньшей мере одна цепь конъюгирована с лигандом, содержащим одно или несколько производных GalNAc.

2. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по п. 1, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 19 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности 5'-UCAUCCACAAUGAGAGUAA-3' (SEQ ID NO: 679).

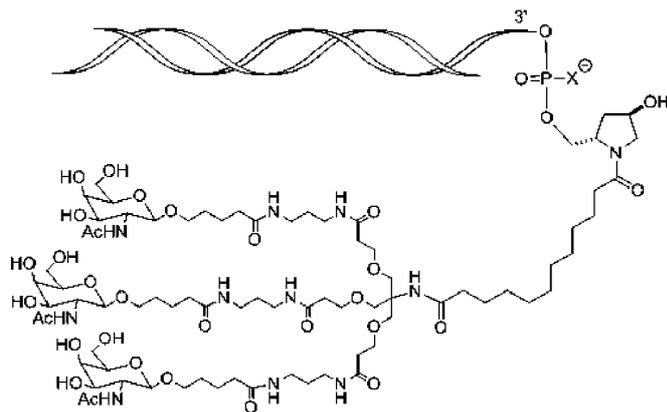
3. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по п. 1, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 19 непрерывных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-UCAUCCACAAUGAGAGUAA-3' (SEQ ID NO: 679).

4. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по п. 1, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 20 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности 5'-UCAUCCACAAUGAGAGUAA-3' (SEQ ID NO: 679).

5. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по п. 1, где указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 20 непрерывных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-UCAUCCACAAUGAGAGUAA-3' (SEQ ID NO: 679), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 20 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности 5'-UUACUCUCAUUGUGGAUGA-3' (SEQ ID NO: 876).

6. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по любому из пп. 1-5, где по меньшей мере одну из указанных нуклеотидных модификаций выбирают из группы, состоящей из модификации 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, модификации 2'-O-метил-нуклеотида, модификации 2'-фтор-нуклеотида, модификации 2'-дезокси-нуклеотида, модификации блокированного нуклеотида, модификации разблокированного нуклеотида, модификации конформационно ограниченного нуклеотида, модификации конформационно затрудненного этилнуклеотида, модификации абазического нуклеотида, модификации 2'-амино-нуклеотида, модификации 2'-алкил-нуклеотида, модификации морфолино-нуклеотида, модификации нуклеотида фосфорамидата, модификации нуклеотида, содержащего неприродное основание, модификации нуклеотида, содержащего 5'-фосфортиоатную группу, и модификации концевого нуклеотида, соединенного с холестерилловым производным или группой бисдециламида додекановой кислоты.

7. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по любому из пп. 1-6, где по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере из 1 нуклеотида.
8. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по любому из пп. 1-7, где по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере из 2 нуклеотидов.
9. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по любому из пп. 1-8, где двухцепочечная область имеет длину из 19-23 пар нуклеотидов.
10. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по п. 9, где двухцепочечная область имеет длину из 19-21 пар нуклеотидов.
11. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по любому из пп. 1-10, где каждая цепь отдельно имеет длину из 19-30 нуклеотидов.
12. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по любому из пп. 1-11, где каждая цепь отдельно имеет длину 20-30 нуклеотидов.
13. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по любому из пп. 1-12, где каждая цепь отдельно имеет длину 19-25 нуклеотидов.



где X представляет собой O или S.

19. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по любому из пп. 1-18, где указанная двухцепочечная РНКи или ее соль дополнительно содержит меньшей мере одну фосфортиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

20. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по п. 19, где фосфортиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной цепи.

21. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по п. 20, где указанная цепь представляет собой антисмысловую цепь.

22. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по п. 20, где указанная цепь представляет собой смысловую цепь.

23. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по п. 19, где фосфортиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи.

24. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по п. 23, где указанная цепь представляет собой антисмысловую цепь.

25. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по п. 23, где указанная цепь представляет собой смысловую цепь.

26. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по п. 19, где фосфортиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится, как на 5'-конце, так и на 3'-конце одной цепи.

27. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по п. 26, где указанная цепь представляет собой антисмысловую цепь.

28. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по п. 19, где указанная двухцепочечная РНКи или ее соль содержит 6-8 фосфортиоатных межнуклеотидных связей.

29. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по п. 28, где антисмысловая цепь содержит две фосфортиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфортиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце и смысловая цепь содержит по меньшей мере две фосфортиоатных межнуклеотидных связи на 5'-конце или 3'-конце.

30. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по любому из пп. 1-29, где пара оснований в 1 положении

от 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU.

31. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль для ингибирования экспрессии ангиотензиногена (AGT),

где двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (РНКи) или его соль содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, формирующие двухцепочечную область,

где указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 19 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности 5'-UCAUCCACAAUGAGAGUAA-3' (SEQ ID NO: 679), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 19 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности 5'-UUACUCUCAUUGUGGAUGA-3' (SEQ ID NO: 876)

где все нуклеотиды указанной смысловой цепи содержат модификацию,

где указанная смысловая цепь содержит две фосфориотатные межнуклеотидные связи на 5'-конце,

где все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи содержат модификацию,

где указанная антисмысловая цепь содержит две фосфориотатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфориотатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и

где по меньшей мере одна цепь конъюгирована с лигандом, содержащим одно или несколько производных GalNAc.

32. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по п. 31, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 19 непрерывных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-UCAUCCACAAUGAGAGUAA-3' (SEQ ID NO: 679).

33. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по п. 31, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 20 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 1 нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'-UCAUCCACAAUGAGAGUAA-3' (SEQ ID NO: 679).

34. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по п. 31, где указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 20 непрерывных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-UCAUCCACAAUGAGAGUAA-3' (SEQ ID NO: 679), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 20 непрерывных нуклеотидов, отличающихся не больше чем на 1 нуклеотида от нуклеотидной последовательности 5'-UUACUCUCAUUGUGGAUGA-3' (SEQ ID NO: 876).

35. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по любому из пп. 31-34, где по меньшей мере одну из указанных нуклеотидных модификаций выбирают из группы, состоящей из модификации 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, модификации 2'-O-метил-нуклеотида, модификации 2'-фтор-нуклеотида, модификации 2'-дезокси-нуклеотида, модификации блокированного нуклеотида, модификации разблокированного нуклеотида, модификации конформационно ограниченного нуклеотида, модификации конформационно затрудненного этилнуклеотида, модификации абазического нуклеотида, модификации 2'-амино-нуклеотида, модификации 2'-алкил-нуклеотида, модификации морфолино-нуклеотида, модификации нуклеотида фосфорамидата, модификации нуклеотида, содержащего неприродное основание, модификации нуклеотида, содержащего 5'-фосфортиоатную группу, и

модификации концевое нуклеотида, соединенного с холестерилловым производным или группой бисдециламида додекановой кислоты.

36. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по любому из пп. 31-35, где по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере из 1 нуклеотида.

37. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по любому из пп. 31-36, где по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

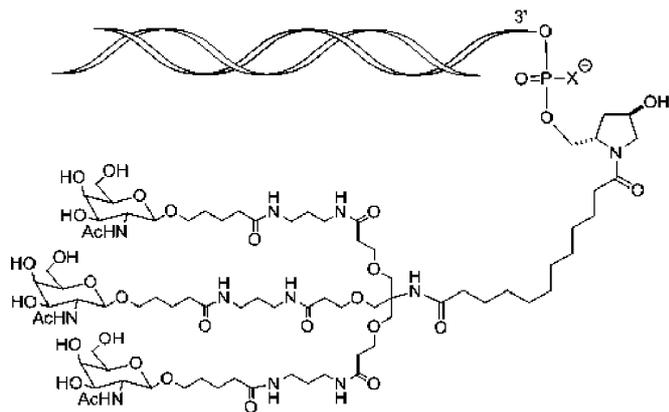
38. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по любому из пп. 31-37, где каждая цепь отдельно имеет длину из 19-23 пар нуклеотидов.

39. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по п. 38, где каждая цепь отдельно имеет длину из 19-21 пар нуклеотидов.

40. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по любому из пп. 31-39, где каждая цепь отдельно имеет длину из 19-30 нуклеотидов.

41. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по любому из пп. 31-40, где каждая цепь отдельно имеет длину из 20-30 нуклеотидов.

42. Средство из двухцепочечных рибонуклеиновых кислот (РНКи) или его соль по любому из пп. 31-41, где каждая цепь отдельно имеет длину из 19-25 нуклеотидов.



где X представляет собой O или S.

48. Выделенная клетка, содержащая двухцепочечную РНКи или ее соль по любому из пп. 1-47.

49. Фармацевтическая композиция, содержащая двухцепочечную РНКи или ее соль по любому из пп. 1-47, для применения в способе лечения субъекта, страдающего ассоциированным с ангиотензиногеном (АГТ) нарушением.

50. Фармацевтическая композиция по п. 49, где двухцепочечная РНКи присутствует в небуферном растворе.

51. Фармацевтическая композиция по п. 50, где указанный небуферный раствор представляет собой физиологический раствор или воду.

52. Фармацевтическая композиция по п.49 где двухцепочечная РНКи присутствует в буферном растворе.

53. Фармацевтическая композиция по п. 52 где указанный буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или какое-либо их сочетание.

54. Фармацевтическая композиция по п. 53, где указанный буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буфер (PBS).

55. Способ ингибирования экспрессии ангиотензиногена (AGT) в клетке *in vitro*, где способ включает:

(a) приведение клетки в контакт с двухцепочечной РНКи или ее солью по любому из пп. 1-47 или с фармацевтической композицией по любому из пп.49-54; и

(b) поддержание клетки, полученной на стадии (a), в течение периода времени, достаточного для достижения деградации мРНК транскрипта гена AGT, тем самым ингибируя экспрессию гена AGT в клетке.

56. Способ по п. 55, где экспрессию AGT ингибируют по меньшей мере приблизительно на 30%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70%, приблизительно на 80%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 98% или приблизительно на 100%.

57. Применение терапевтически эффективного количества двухцепочечной РНКи или ее соли по любому из пп. 1-47 или с фармацевтическую композицию по любому из пп.49-54 для лечения субъекта, страдающего ассоциированным с ангиотензиногеном (AGT) нарушением.

58. Применение по п. 57, где субъектом является человек.

59. Применение по п. 57, где заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, выбирают из группы, состоящей из гипертензии, пограничной гипертензии, первичной гипертензии, вторичной гипертензии, гипертонического криза, экстренного гипертонического состояния, изолированной систолической или диастолической

гипертензии, гипертензии, ассоциированной с беременностью, диабетической гипертензии, резистентной гипертензии, рефракторной гипертензии, пароксизмальной гипертензии, реноваскулярной гипертензии, гипертензии Голдблатта, глазной гипертензии, глаукомы, легочной гипертензии, портальной гипертензии, системной венозной гипертензии, систолической гипертензии, лабильной гипертензии; гипертензивной кардиопатии, гипертензивной нефропатии, атеросклероза, артериосклероза, васкулопатии, диабетической нефропатии, диабетической ретинопатии, хронической сердечной недостаточности, кардиомиопатии, диабетической кардиомиопатии, гломерулосклероза, коарктации аорты, аневризмы аорты, фиброза желудочков, синдрома Кушинга и других состояний избытка глюкокортикоидов, включая хроническую стероидную терапию, феохромоцитому, рениному, вторичный альдостеронизм, и других состояний избытка минералокортикоидов, апноэ во сне, заболевания щитовидной/паращитовидной железы, сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, стенокардии, инсульта, сахарного диабета, заболевания почек, почечной недостаточности, системного склероза, задержки внутриутробного развития (IUGR) и задержки развития плода.

60. Применение по п. 57, где двухцепочечная РНКи или ее соль предназначена для введения подкожно.

61. Применение по п. 57, где двухцепочечная РНКи или ее соль предназначена для введения внутривенно.

62. Применение по п. 57, где указанная двухцепочечная РНКи или ее соль предназначена для введения в двух или более дозах.

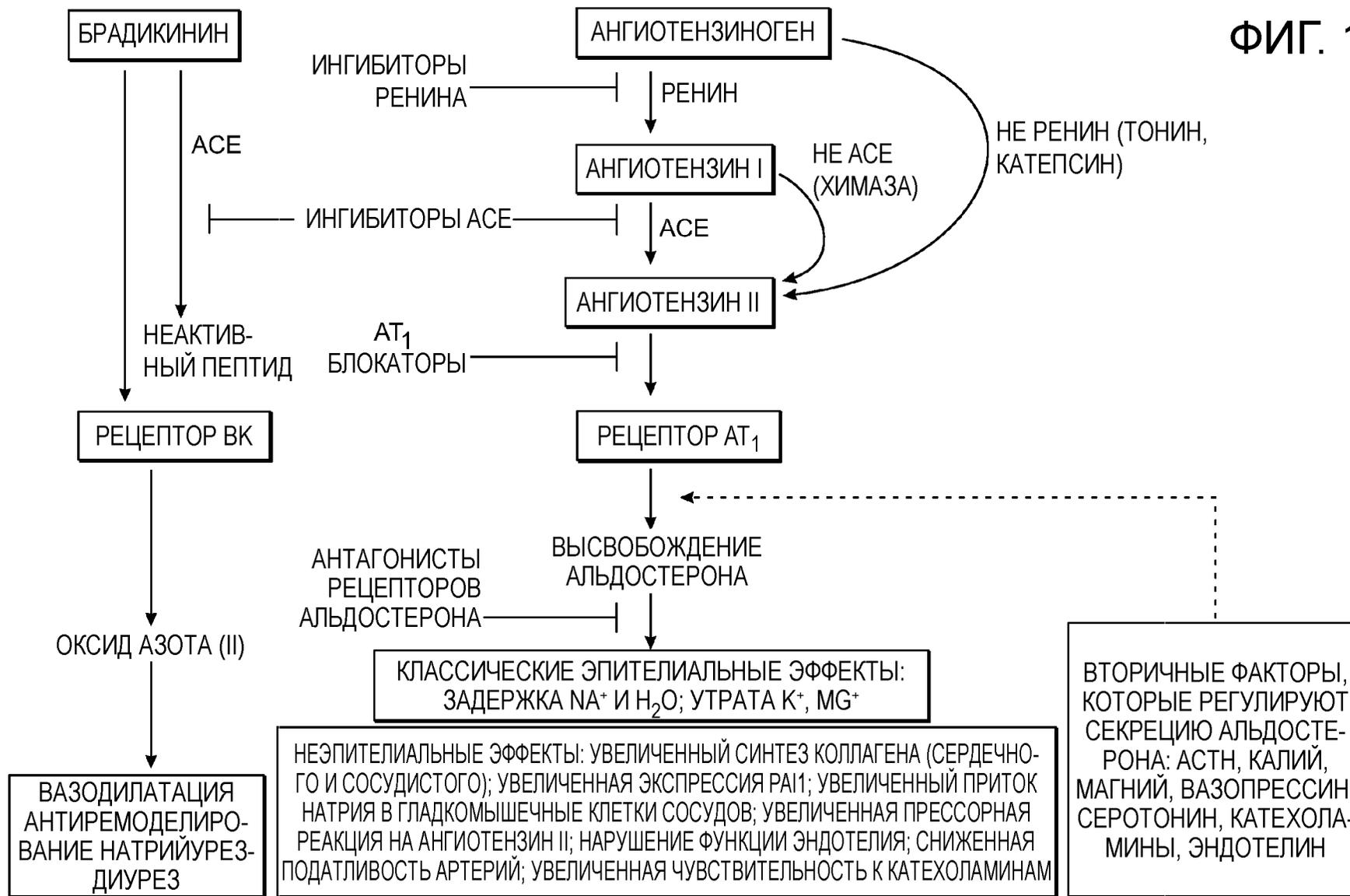
63. Применение по п. 57, дополнительно включающее введение субъектудополнительного терапевтического средства.

64. Применение по п. 63, где дополнительное терапевтическое средство выбирают из группы, состоящей из диуретика, ингибитора ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ), антагониста рецептора ангиотензина II, бета-блокатора, вазодиллятора, блокатора кальциевых каналов, антагониста альдостерона, альфа₂-агониста, ингибитора ренина, альфа-блокатора, адренергического средства периферического действия, избирательного частичного агониста рецептора D1, неизбирательного альфа-адренергического антагониста, синтетического, стероидного антиминералкортикоидного средства или комбинации каких-либо из приведенных выше и терапевтического средства от гипертензии, сформулированного в виде комбинации средств.

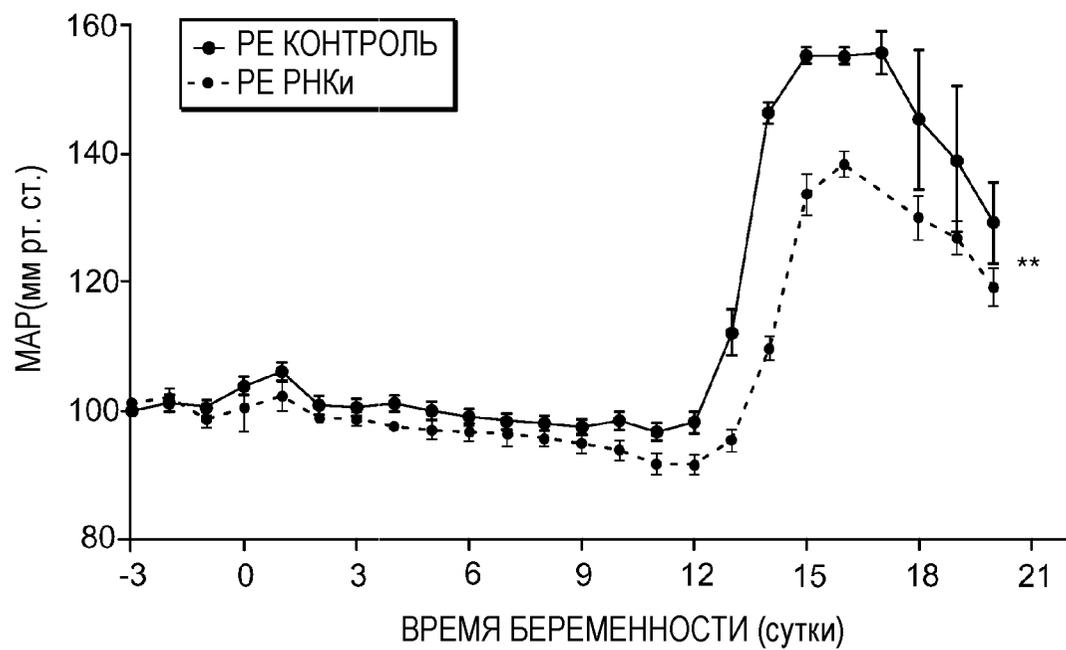
65. Применение по п. 64, где заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, представляет собой гипертензию.

66. Применение по п. 65, где гипертензию выбирают из группы, состоящей из пограничной гипертензии, первичной гипертензии, вторичной гипертензии, гипертонического криза, экстренного гипертензивного состояния, изолированной систолической или диастолической гипертензии, гипертензии, ассоциированной с беременностью, диабетической гипертензии, резистентной гипертензии, рефракторной гипертензии, пароксизмальной гипертензии, реноваскулярной гипертензии, гипертензии Голдблатта, глазной гипертензии, глаукомы, легочной гипертензии, портальной гипертензии, системной венозной гипертензии, систолической гипертензии, лабильной гипертензии; гипертензивной кардиопатии и гипертензивной нефропатии.

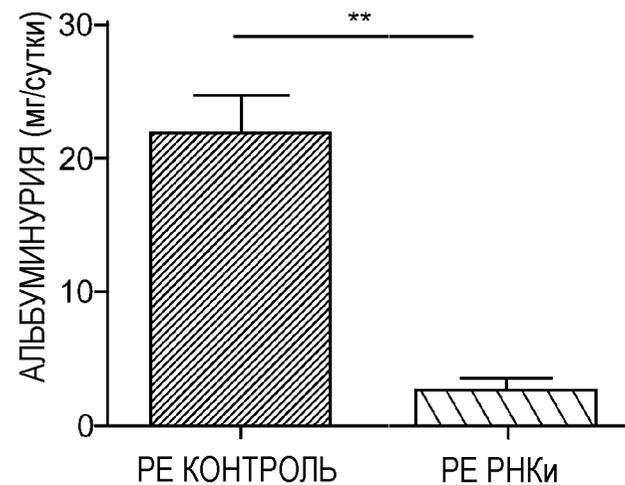
ФИГ. 1



СНИЖЕНИЕ КРОВЯНОГО ДАВЛЕНИЯ И АЛЬБУМИНУРИЯ

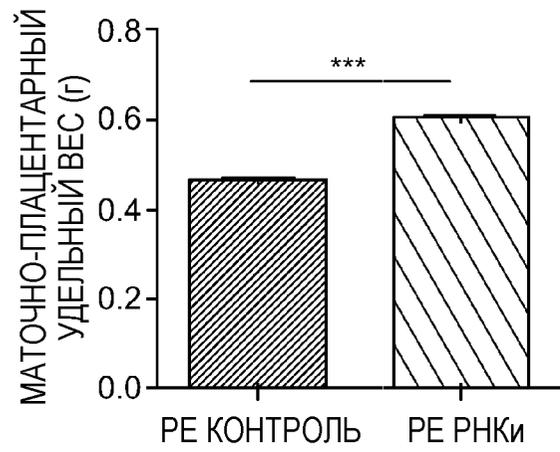


ФИГ. 2А

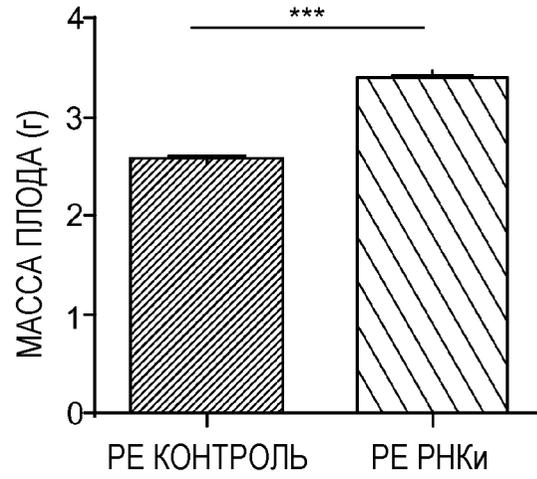


ФИГ. 2В

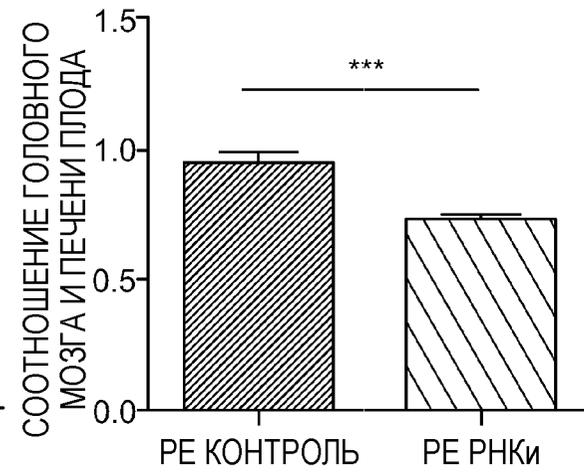
УЛУЧШЕНИЕ ИСХОДА ПЛОДА



ФИГ. 3А



ФИГ. 3В

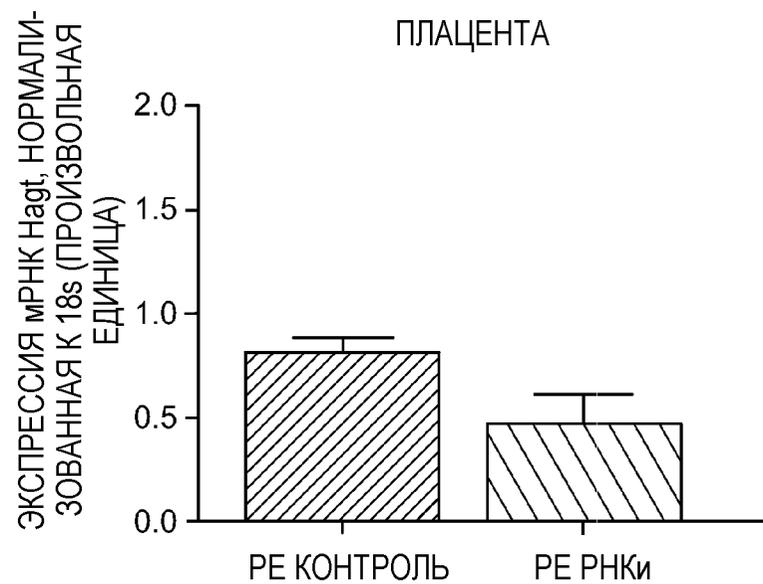


ФИГ. 3С

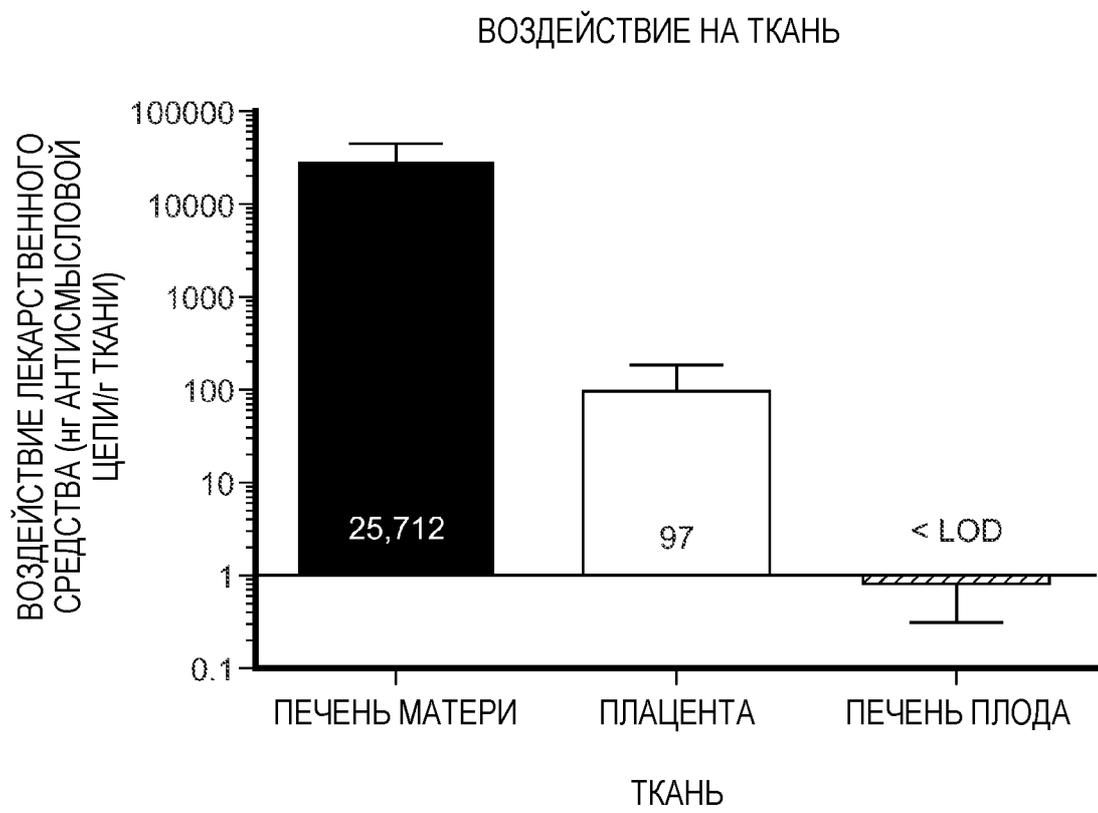
МИРНК НЕ ПРОХОДИТ ЧЕРЕЗ ПЛАЦЕНТАРНЫЙ БАРЬЕР



ФИГ. 4А



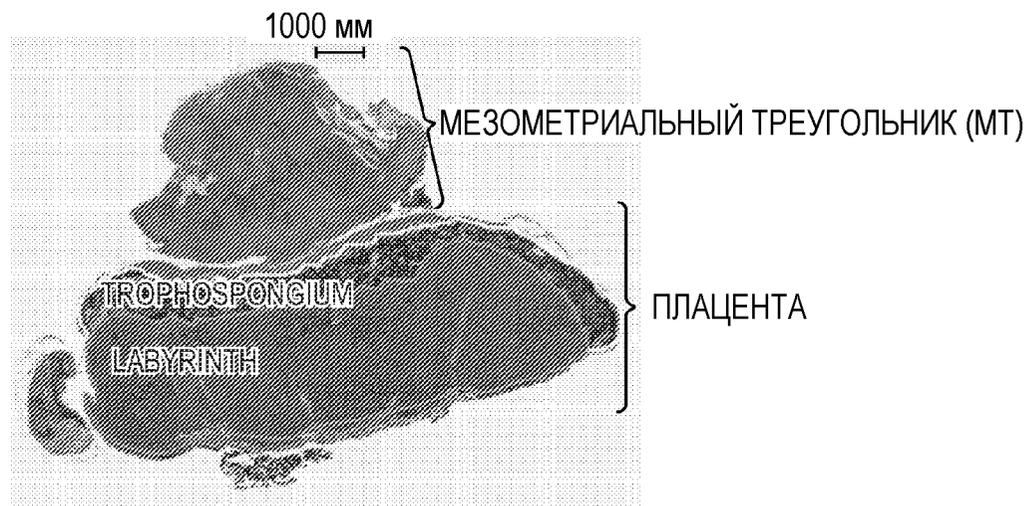
ФИГ. 4В



ФИГ. 5

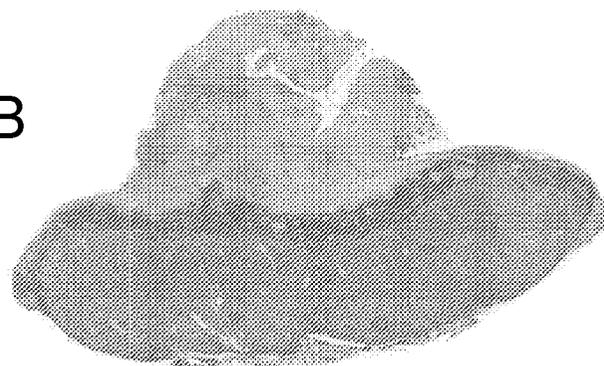
УСИЛЕННЫЙ АЛИМЕНТАРНЫЙ ОБМЕН ИЗ-ЗА УВЕЛИЧЕННОГО ПРОФИЛЯ ЛАБИРИНТА

ФИГ. 6А



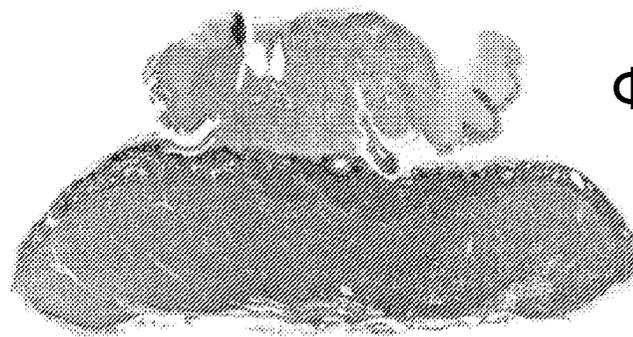
РЕ КОНТРОЛЬ

ФИГ. 6В



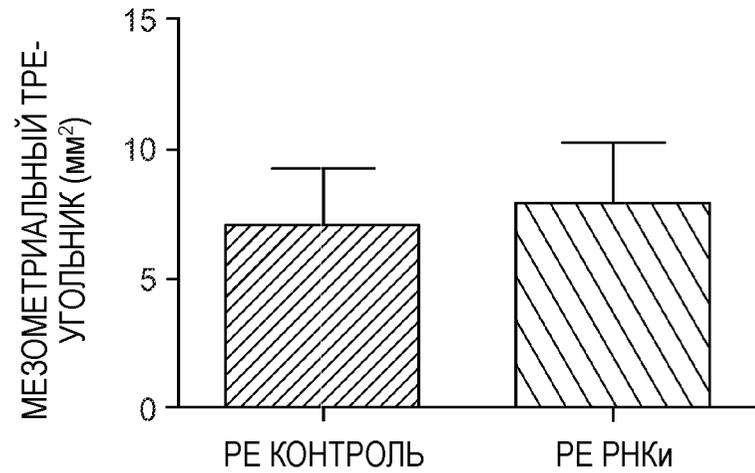
РЕ РНКи

ФИГ. 6С

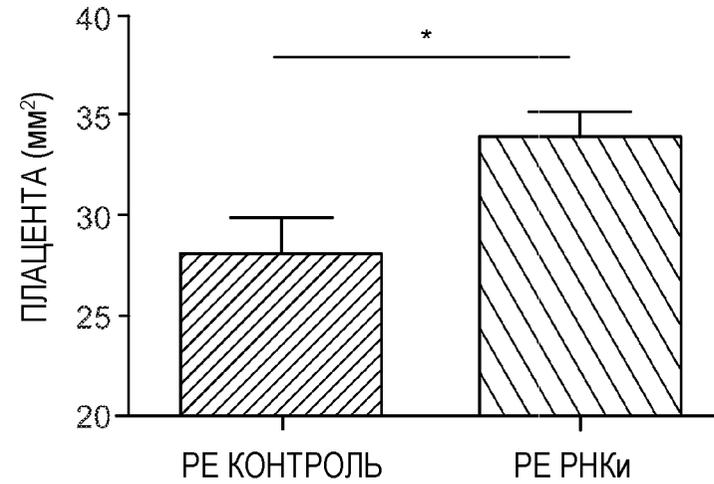


МАТОЧНО-ПЛАЦЕНТАРНОЕ ЗВЕНО, ОКРАШЕННОЕ НА ЦИТОКЕРАТИН

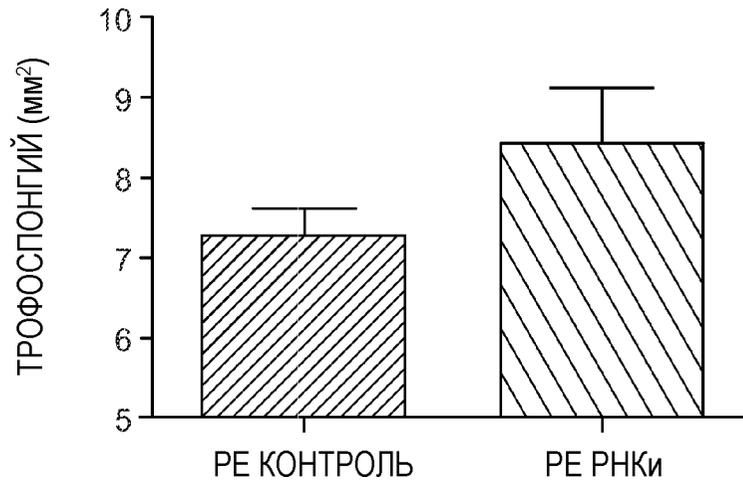
ФИГ. 6D



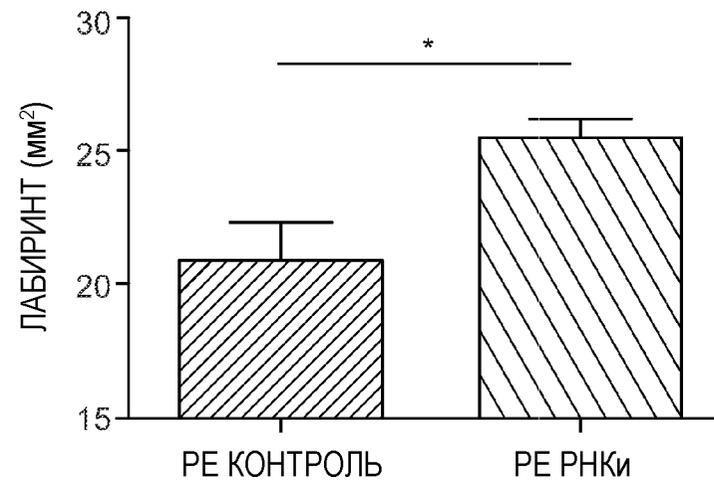
ФИГ. 6F



ФИГ. 6E



ФИГ. 6G

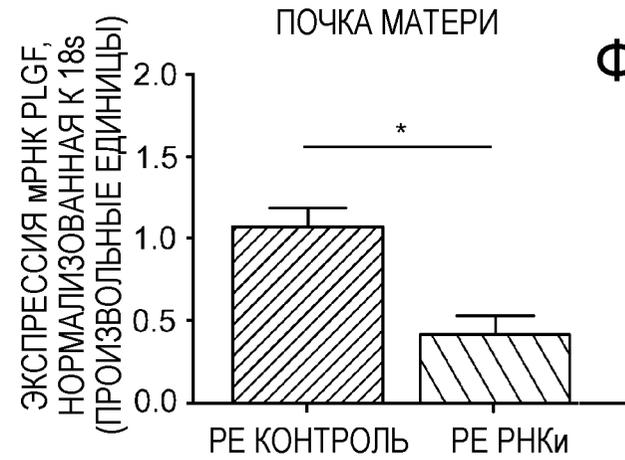


СНИЖЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ SFLT1 И PLGF В ПОЧКЕ МАТЕРИ

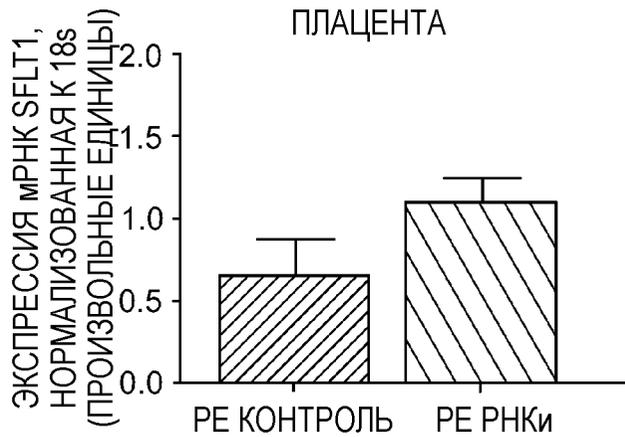
ФИГ. 7А



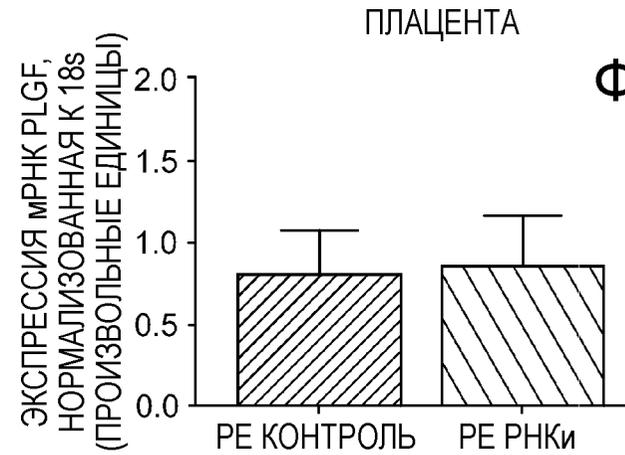
ФИГ. 7В



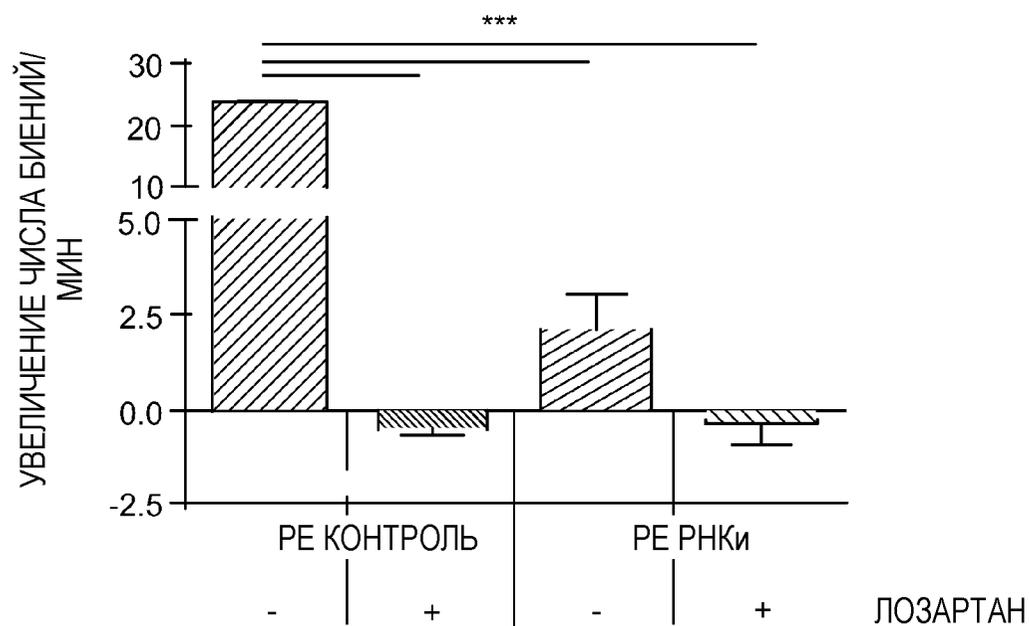
ФИГ. 7С



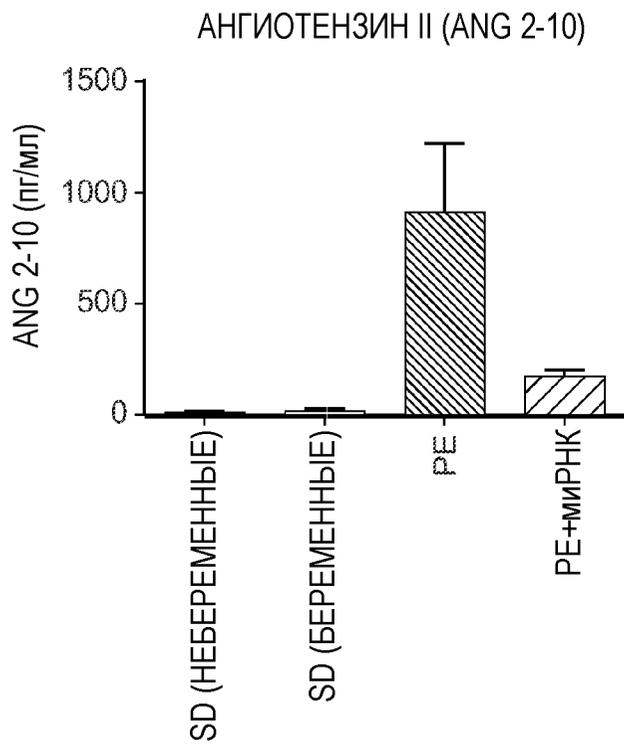
ФИГ. 7D



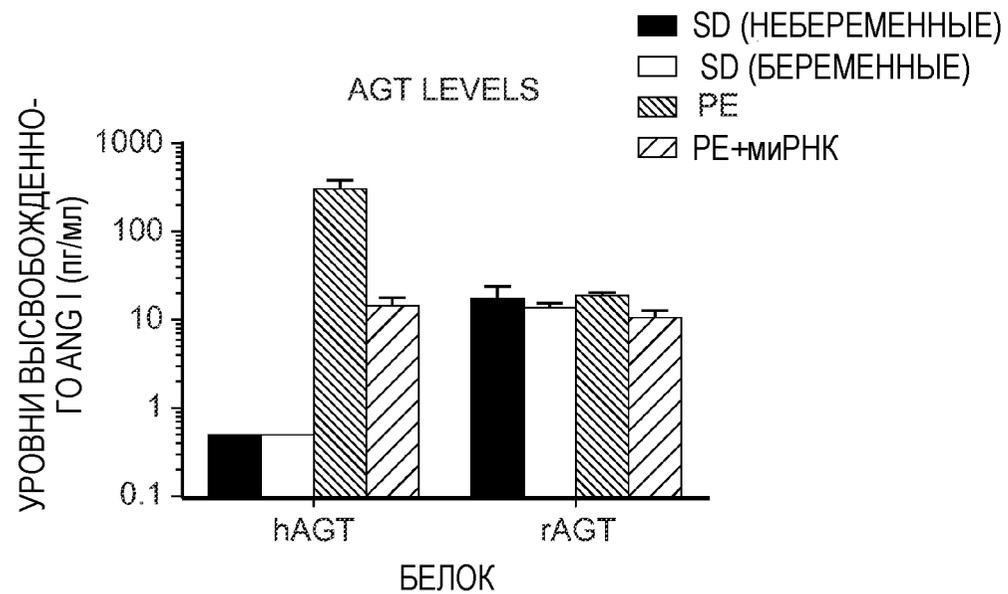
СНИЖЕНИЕ АГОНИСТИЧЕСКИХ АУТОАНТИТЕЛ К РЕЦЕПТОРУ АНГИОТЕНЗИНА 1



ФИГ. 8



ФИГ. 9А



ФИГ. 9В

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 121301-01320	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2015/032099	International filing date (<i>day/month/year</i>) 22 May 2015 (22-05-2015)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 22 May 2014 (22-05-2014)
Applicant ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 9 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed
- a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant
- the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant
- the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1

- as suggested by the applicant
- as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/032099

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

- 1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
- 2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
- 3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/032099

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1, 10-26, 29, 30, 47-55, 57-64, 81-101(completely); 2-9, 27, 28, 31-46, 56
65, 67-80(partially)

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/032099

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/113 A61P9/00
ADD. A61K31/712

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JEFFREY OLEARCZYK ET AL: "Targeting of hepatic angiotensinogen using chemically modified siRNAs results in significant and sustained blood pressure lowering in a rat model of hypertension", HYPERTENSION RESEARCH, vol. 37, no. 5, 12 December 2013 (2013-12-12), pages 405-412, XP055206991, ISSN: 0916-9636, DOI: 10.1038/hr.2013.155	1,5-64, 68-101
A	the whole document -/--	2-4,65, 67

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 16 October 2015	Date of mailing of the international search report 28/10/2015
--	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Spindler, Mark-Peter
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/032099

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	-& Jeffrey Olearczyk ET AL: "Suppl. Table 1; Targeting of hepatic angiotensinogen using chemically modified siRNAs results in significant and sustained blood pressure lowering in a rat model of hypertension", Hypertension Research, 12 December 2013 (2013-12-12), XP055206994, Retrieved from the Internet: URL:http://www.nature.com/hr/journal/v37/n5/extref/hr2013155x3.doc [retrieved on 2015-08-10] the whole document	
X	----- WO 2014/018930 A1 (ISIS PHARMACEUTICALS INC [US]; CROOKE ROSANNE M; GRAHAM MARK J) 30 January 2014 (2014-01-30)	1,5-64, 68-101
A	the whole document	2-4,65, 67
A	----- WO 2010/042749 A2 (CHIMEROS INC [US]; DE LOS RIOS MIGUEL [US]; MENDLEIN JOHN [US]; BULLOC) 15 April 2010 (2010-04-15)	1-65, 67-101
A	the whole document	
A	----- Z-W YE ET AL: "Knockdown of angiotensinogen by shRNA-mediated RNA interference inhibits human visceral preadipocytes differentiation", INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY., vol. 34, no. 1, 29 September 2009 (2009-09-29), pages 157-164, XP055221384, GB ISSN: 0307-0565, DOI: 10.1038/ijo.2009.197	1-65, 67-101
A	the whole document	
A	----- WO 2009/073809 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; MANOHARAN MUTHIAH [US]; RAJEEV KALLA) 11 June 2009 (2009-06-11)	1,5-64, 68-101
A	cited in the application	
A	the whole document	
A	----- WO 2013/075035 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS [US]) 23 May 2013 (2013-05-23)	1,5-64, 68-101
A	cited in the application	
A	claims 1, 24; example 5; table 2	
A	----- WO 2013/163430 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS [US]; AKINC AKIN [US]; SEHGAL ALFICA [US]; TOU) 31 October 2013 (2013-10-31)	1,5-64, 68-101
A	claim 17; examples 8, 9; table 15	
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/032099

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 2012/177949 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; TOUDJARSKA IVANKA [US]; MARAGANORE J) 27 December 2012 (2012-12-27) paragraphs [0020] - [0022]; example 4; tables 8-11</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,5-64, 68-101
X,P	<p>Anonymous: "ALN-AGT, an RNAi Therapeutic in Development for the Treatment of Hypertensive Disorders of Pregnancy", American Heart Association's High Blood Pressure Research 2014, 11 September 2014 (2014-09-11), XP055207158, Retrieved from the Internet: URL:http://www.alnylam.com/web/assets/ALN-AGT_HBPR_presentation_09112014.pdf [retrieved on 2015-08-11] the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,5-64, 68-101

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2015/032099

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014018930 A1	30-01-2014	EP 2877579 A1 WO 2014018930 A1	03-06-2015 30-01-2014
WO 2010042749 A2	15-04-2010	US 2011293725 A1 WO 2010042749 A2	01-12-2011 15-04-2010
WO 2009073809 A2	11-06-2009	AU 2008333811 A1 AU 2008340355 A1 CA 2708153 A1 CA 2708173 A1 CN 102006890 A EP 2229186 A2 EP 2231195 A2 JP 5519523 B2 JP 5635412 B2 JP 2011505425 A JP 2011505426 A JP 2014139232 A JP 2015025007 A US 2009239814 A1 US 2009247608 A1 US 2012136042 A1 US 2013178512 A1 US 2014179761 A1 US 2015011615 A1 US 2015119444 A1 US 2015119445 A1 WO 2009073809 A2 WO 2009082607 A2	11-06-2009 02-07-2009 11-06-2009 02-07-2009 06-04-2011 22-09-2010 29-09-2010 11-06-2014 03-12-2014 24-02-2011 24-02-2011 31-07-2014 05-02-2015 24-09-2009 01-10-2009 31-05-2012 11-07-2013 26-06-2014 08-01-2015 30-04-2015 30-04-2015 11-06-2009 02-07-2009
WO 2013075035 A1	23-05-2013	AR 088911 A1 AU 2012340159 A1 CA 2856243 A1 CL 2014001291 A1 CL 2014002742 A1 CN 104080794 A CO 7020872 A2 CR 20140232 A DO P2014000107 A EP 2780353 A1 HK 1200171 A1 JP 2014534244 A KR 20140092921 A PE 23622014 A1 PH 12014501106 A1 SG 11201402392Q A US 2014315835 A1 WO 2013075035 A1	16-07-2014 22-05-2014 23-05-2013 26-09-2014 13-02-2015 01-10-2014 11-08-2014 25-09-2014 30-11-2014 24-09-2014 31-07-2015 18-12-2014 24-07-2014 30-01-2015 11-08-2014 27-06-2014 23-10-2014 23-05-2013
WO 2013163430 A2	31-10-2013	AR 090869 A1 AU 2013251494 A1 CA 2869922 A1 CN 104520310 A CO 7240361 A2 EP 2841443 A2 JP 2015519047 A KR 20150003344 A US 2013317081 A1	10-12-2014 30-10-2014 31-10-2013 15-04-2015 17-04-2015 04-03-2015 09-07-2015 08-01-2015 28-11-2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/032099

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 2013163430 A2	31-10-2013

WO 2012177949 A2	27-12-2012	EP 2723351 A2	30-04-2014
		US 2014142162 A1	22-05-2014
		WO 2012177949 A2	27-12-2012

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 10-26, 29, 30, 47-55, 57-64, 81-101(completely); 5-9, 27, 28, 31-46, 56, 68-80(partially)

subject-matter relating to chemically modified double-stranded RNAi agents wherein the sense strand is conjugated to a ligand

2. claims: 2-9, 27, 28, 31-46, 56, 65, 67-80(all partially)

subject-matter relating to double-stranded RNAi agents wherein the sense strand comprises at least 15 contiguous nucleotides differing by no more than 3 nucleotides from nucleotides 2081-2104 of the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 and the antisense strand comprises at least 15 contiguous nucleotides differing by no more than 3 nucleotides from the nucleotides at the corresponding position of the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 2

3. claims: 2-9, 27, 28, 31-46, 56, 65, 67-80(all partially)

as in 2) but relating to double-stranded RNAi agents targeting other regions within the human angiotensinogen mRNA (SEQ ID NO: 1) as indicated in claim 2

4. claims: 66(completely); 68-80(partially)

subject-matter relating to modified antisense polynucleotides targeting different regions within the human angiotensinogen mRNA (SEQ ID NO: 1)
