

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045986**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2024.01.24

(21) Номер заявки

202190895

(22) Дата подачи заявки

2019.11.13

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)*A61K 31/713* (2006.01)*A61P 9/00* (2006.01)**(54) НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ LPA В КЛЕТКЕ**

(31) PCT/EP2018/081106; 19174466.3

(32) 2018.11.13; 2019.05.14

(33) EP

(43) 2021.08.10

(86) PCT/EP2019/081158

(87) WO 2020/099476 2020.05.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

САЙЛЕНС ТЕРАПЬЮТИКС ГМБХ  
(DE)

(72) Изобретатель:

Ридер Давид Антони, Бетге Лукас,  
Фраундорф Кристиан, Вайнгертнер  
Адриен, Хауптман Юдит, Дамес  
Зибилле, Шуберт Штеффен, Тенбаум  
Штефан (DE)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A2-2017059223

TADIN-STRAPPS MARIJA ET AL.:  
"Development of Lipoprotein(a) siRNAs for  
Mechanism of Action Studies in Non-Human  
Primate Models of Atherosclerosis", JOURNAL  
OF CARDIOVASCULAR TRANSLATIONAL  
RESEARCH, SPRINGER US, BOSTON, vol. 8,  
no. 1, 21 January 2015 (2015-01-21), pages 44-53,  
XP035461835, ISSN: 1937-5387, DOI:10.1007/  
S12265-014-9605-1 [retrieved on 2015-01-21] tables  
1-3

WO-A1-2016149020

WO-A2-2005000201

MARK J. GRAHAM ET AL.: "Antisense  
inhibition of apolipoprotein (a) to lower plasma  
lipoprotein (a) levels in humans", JOURNAL OF  
LIPID RESEARCH, vol. 57, no. 3, 4 November  
2015 (2015-11-04), pages 340-351, XP055502501,  
US, ISSN: 0022-2275, DOI: 10.1194/jlr.R052258,  
figure 1; table 1KURT B. ET AL.: "Lipoprotein(a) clinical  
aspects and future challenges", CLINICAL  
RESEARCH IN CARDIOLOGY SUPPLEMENTS  
2015 SPRINGER VERLAGDEU, vol. 10, no.  
1, 3 March 2015 (2015-03-03), pages 26-32,  
XP009506615, ISSN: 1861-0706, DOI:10.1007/  
S11789-015-0075-Z [retrieved on 2015-03-03] the  
whole documentKONRAD SCHMIDT ET AL.: "Structure,  
function, and genetics of lipoprotein (a)", JOURNAL  
OF LIPID RESEARCH, vol. 57, no. 8, 13 April  
2016 (2016-04-13), pages 1339-1359, XP055502476,  
US, ISSN: 0022-2275, DOI:10.1194/jlr.R067314, the  
whole document

WO-A1-2019092283

WO-A1-2019092282

(57) В изобретении предложены продукты и композиции, а также варианты их применения. В частности, в изобретении предложены продукты нуклеиновой кислоты, которые препятствуют экспрессии гена LPA или ингибируют его экспрессию, предпочтительно для применения в качестве лечения, предотвращения или уменьшения риска развития сердечно-сосудистого заболевания, такого как ишемическая болезнь сердца или стеноз аорты, или инсульта, или любого другого нарушения, патологии или синдрома, связанных с повышенными уровнями частиц Lp(a).

**B1****045986****045986****B1**

### Область техники

В соответствии с настоящим изобретением предложены продукты и композиции, а также варианты их применения. В частности, настоящее изобретение относится к производным нуклеиновых кислот, которые препятствуют экспрессии гена LPA или ингибируют его экспрессию. Такая лечебная терапия, направленная на снижение Lp(a), служит для предотвращения и уменьшения риска развития инсульта, атеросклероза, тромбоза и сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца и стеноз аорты, или любого другого нарушения, патологии или синдрома, связанных с повышенными уровнями частиц Lp(a).

### Уровень техники

Было показано, что двухцепочечные РНК (дцРНК), способные комплементарно связывать экспрессированную мРНК, способны блокировать экспрессию генов (Fire et al., 1998, Nature. 1998 Feb 19;391(6669):806-11 и Elbashir et al., 2001, Nature. 2001 May 24; 411(6836):494-8) с помощью механизма, который был назван РНК-интерференцией (РНКи). Короткие дцРНК направляют геноспецифичное посттранскрипционное подавление ("silencing") у многих организмов, включая позвоночных, и такие молекулы стали полезным инструментом для изучения функции генов. РНКи опосредуется РНК-индуцированным комплексом подавления (RISC), специфичной в отношении последовательности многокомпонентной нуклеазой, которая разрушает информационные РНК, гомологичные иницирующему фактору подавления, загруженному в комплекс RISC. Интерферирующие РНК (называемые в настоящей заявке иРНК), такие как миРНК, антисмысловые РНК и микроРНК, представляют собой олигонуклеотиды, которые предотвращают образование белков путем подавления генов, т.е. ингибируют трансляцию гена белка за счет разрушения молекул мРНК. Агенты, подавляющие гены, приобретают все большее значение для терапевтических применений в медицине.

Согласно Watts and Corey в Journal of Pathology (2012; Vol. 226, p. 365-379), существуют алгоритмы, которые можно применять для конструирования иницирующих факторов подавления нуклеиновых кислот, однако все они имеют серьезные ограничения. Для идентификации эффективных иРНК могут потребоваться различные экспериментальные способы, поскольку алгоритмы не учитывают такие факторы как третичная структура мРНК-мишени или участие РНК-связывающих белков. Таким образом, обнаружение эффективного иницирующего фактора подавления нуклеиновой кислоты с минимальными нецелевыми эффектами является сложным процессом. Для фармацевтической разработки этих весьма потенциально опасных молекул необходимо, чтобы их синтез был экономически выгодным, они распределялись по тканям-мишеням, проникали в клетки и функционировали в приемлемых пределах токсичности.

Частицы Lp(a) представляют собой гетерогенные частицы липопротеина низкой плотности, экспрессируемые преимущественно в печени (Witztum and Ginsberg, J. Lipid Res. 2016 Mar; 57(3):336-9). Они состоят из аполипопротеина (a) (Apo(a) или Lp(a), кодируемого геном LPA), соединенного с ЛПНП-подобной частицей за счет полипептида ApoB. Высокие уровни частиц Lp(a) в сыворотке, обусловленные генетически, не зависят от рациона и физических упражнений и ассоциированы с повышенным риском развития сердечно-сосудистого заболевания за счет ассоциированного потенциала к развитию атеросклероза (Alonso et al., Journal of the American College of Cardiology Vol. 63, No. 19, 2014). С точки зрения диагностики и превентивной медицины уровень частиц Lp(a) в сыворотке крови пациента является широко распространенным, независимым генетическим фактором риска развития ишемической болезни сердца и стеноза аорты (Saeedi and Frohlich Clinical Diabetes and Endocrinology (2016) 2:7). В настоящее время не существует одобренной специфической терапии, направленной на уменьшение уровня частиц Lp(a), помимо косвенных стандартных общих мер по снижению ЛПНП. Соответственно, в настоящее время существует потребность в способах эффективного лечения, предотвращения и уменьшения риска развития нарушений, таких как инсульт, атеросклероз, тромбоз и сердечно-сосудистые заболевания или ассоциированных с ними, таких как ишемическая болезнь сердца, стеноз аорты и другие пока не идентифицированные ассоциированные нарушения, патологии или синдромы. Настоящее изобретение направлено на решение этой неудовлетворенной медицинской потребности.

### Краткое описание изобретения

Первый аспект изобретения относится к нуклеиновой кислоте для ингибирования экспрессии LPA в клетке, содержащей по меньшей мере одну дуплексную область, которая содержит по меньшей мере часть первой цепи и по меньшей мере часть второй цепи, которая по меньшей мере частично комплементарна первой цепи, причем указанная первая цепь по меньшей мере частично комплементарна по меньшей мере части РНК, транскрибированной с гена LPA, при этом указанная первая цепь содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 или 43, где нуклеотиды в положениях 2 и 14 от 5'-конца первой цепи модифицированы посредством 2'-фтор модификации, и нуклеотиды на второй цепи, которые соответствуют положениям 11-13 первой цепи, модифицированы посредством 2'-фтор модификации.

Согласно настоящему изобретению также предложена композиция, содержащая нуклеиновую кислоту или конъюгированную нуклеиновую кислоту согласно любому аспекту настоящего изобретения и необязательно физиологически приемлемое вспомогательное вещество.

Один аспект также относится к нуклеиновой кислоте, которая способна ингибировать экспрессию LPA для применения в качестве лекарственного средства.

Также предложена нуклеиновая кислота или конъюгированная нуклеиновая кислота в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения для применения при лечении заболевания, нарушения или синдрома и/или для получения лекарственного средства для лечения заболевания, нарушения или синдрома.

Согласно настоящему изобретению предложен способ лечения или предотвращения заболевания, нарушения или синдрома, включающий введение композиции, содержащей нуклеиновую кислоту или конъюгированную нуклеиновую кислоту в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения индивидууму, нуждающемуся в лечении. Нуклеиновую кислоту или конъюгированную нуклеиновую кислоту можно вводить субъекту подкожно, внутривенно или с помощью любых других способов введения, таких как пероральный, ректальный или внутривенный.

Также предусмотрен способ получения нуклеиновой кислоты или конъюгированной нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением.

Нуклеиновую кислоту или композицию, содержащую нуклеиновую кислоту или конъюгированную нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению, можно применять при лечении заболевания, нарушения или синдрома. Лечение может заключаться в предотвращении и уменьшении риска развития инсульта, атеросклероза, тромбоза или сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца или стеноз аорты, и любого другого заболевания или патологии, ассоциированных с повышенными уровнями частиц, содержащих Lp(a).

#### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, которая является двухцепочечной и направлена к экспрессированному транскрипту РНК LPA, и ее композициям. Эти нуклеиновые кислоты или конъюгированные нуклеиновые кислоты можно применять при лечении и предотвращении различных заболеваний, нарушений и синдромов, при которых желательна уменьшенная экспрессия продукта гена LPA.

Один аспект относится к нуклеиновой кислоте для ингибирования экспрессии LPA в клетке, содержащей по меньшей мере одну дуплексную область, которая содержит по меньшей мере часть первой цепи и по меньшей мере часть второй цепи, которая по меньшей мере частично комплементарна первой цепи, причем указанная первая цепь по меньшей мере частично комплементарна по меньшей мере части РНК, транскрибируемой с гена LPA, при этом указанная первая цепь содержит или предпочтительно состоит из нуклеотидной последовательности, выбранной из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 или 43, где нуклеотиды в положениях 2 и 14 от 5'-конца первой цепи модифицированы посредством 2'-фтор модификации, и нуклеотиды на второй цепи, которые соответствуют положениям 11-13 первой цепи, модифицированы посредством 2'-фтор модификации.

Один аспект относится к нуклеиновой кислоте для ингибирования экспрессии LPA в клетке, содержащей по меньшей мере одну дуплексную область, которая включает первую цепь и вторую цепь, которая по меньшей мере частично комплементарна первой цепи, при этом указанная первая цепь по меньшей мере частично комплементарна по меньшей мере части РНК, транскрибируемой из гена LPA, причем указанная первая цепь содержит или предпочтительно состоит из нуклеотидной последовательности, выбранной из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 или 43, где нуклеотиды в положениях 2 и 14 от 5'-конца первой цепи модифицированы посредством 2'-фтор модификации, и нуклеотиды на второй цепи, которые соответствуют положениям 11-13 первой цепи, модифицированы посредством 2'-фтор модификации.

Такие нуклеиновые кислоты способны эффективно снижать экспрессию LPA в клетке и являются очень стабильными. Нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению предпочтительно способна ингибировать экспрессию LPA в клетке до аналогичной, например, такой же, или более высокой степени экспрессии, чем такие же нуклеиновые кислоты с другим типом модификации в сопоставимых условиях. Более конкретно, нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению предпочтительно способна ингибировать экспрессию LPA в клетке на 80, 90, 100, 105, 110 или более процентов по сравнению с такой же нуклеиновой кислотой с другим типом модификации в сопоставимых условиях.

Один аспект относится к нуклеиновой кислоте, в которой все нуклеотиды нуклеиновой кислоты модифицированы в 2'-положении сахара.

Один аспект относится к нуклеиновой кислоте, при этом нуклеиновая кислота предпочтительно модифицирована по всей длине первой цепи чередующимися 2' О-метил и 2'-фтор модификациями.

Один аспект относится к нуклеиновой кислоте, в которой остальные модификации второй цепи представляют собой природные модификации, предпочтительно 2' О-метил. Другими словами, нуклеотиды на второй цепи, которые соответствуют положениям 11-13 первой цепи, модифицированы 2'-фтор модификацией, и все другие нуклеотиды второй цепи модифицированы природной модификацией, которая предпочтительно представляет собой 2'-О-метил.

Вторая цепь может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14,



но состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 41, и необязательно вторую цепь, которая содержит или предпочтительно состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 42; или первую цепь, которая содержит или предпочтительно состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 43, и необязательно вторую цепь, которая содержит или предпочтительно состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 44.

Предложена нуклеиновая кислота, в которой указанная первая цепь содержит или предпочтительно состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 9, и в которой необязательно вторая цепь содержит или предпочтительно состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 10.

Ген LPA содержит последовательности с очень большим количеством повторов. Следовательно, нуклеиновые кислоты первой цепи с очень сходными последовательностями могут иметь идеальную комплементарность последовательностей с очень разными целевыми областями мРНК.

Одним аспектом является нуклеиновая кислота для ингибирования экспрессии LPA в клетке, причем указанная нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере одну дуплексную область, которая содержит: первую цепь; и вторую цепь, причем указанная вторая цепь по меньшей мере частично комплементарна первой цепи, при этом указанная первая цепь содержит последовательность из по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 16, более предпочтительно по меньшей мере 17, еще более предпочтительно по меньшей мере 18 и наиболее предпочтительно по меньшей мере 19 нуклеотидов любой из эталонных последовательностей SEQ ID NO: 9, 5, 1, 3, 7, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 или 43, и при этом количество несовпадений отдельных нуклеотидов и/или делеций и/или вставок в последовательности первой цепи относительно части эталонной последовательности, которая содержится в последовательности первой цепи, составляет не более трех, предпочтительно не более двух, более предпочтительно не более одного и наиболее предпочтительно ноль. Однако последовательность может быть модифицирована посредством ряда модификаций, которые не изменяют идентичность нуклеотида. Например, модификации остова нуклеиновой кислоты не изменяют идентичность нуклеотида, поскольку само основание остается таким же, как в эталонной последовательности.

Согласно одному аспекту первая цепь нуклеиновой кислоты содержит последовательность из по меньшей мере 18 нуклеотидов любой из эталонных последовательностей, предпочтительно любой из эталонных последовательностей SEQ ID NO: 9 и 5, и при этом количество несоответствий отдельных нуклеотидов и/или делеций и/или вставок в последовательности первой цепи относительно части эталонной последовательности, которая содержится в последовательности первой цепи, составляет не более одного, а предпочтительно ноль.

Согласно одному аспекту первая цепь нуклеиновой кислоты содержит последовательность из по меньшей мере 19 нуклеотидов любой из эталонных последовательностей SEQ ID NO: 9 и 5.

Когда в настоящем документе ссылаются на эталонную последовательность, содержащую или состоящую из немодифицированных нуклеотидов, эта ссылка не ограничивается последовательностью с немодифицированными нуклеотидами. Та же ссылка также охватывает ту же нуклеотидную последовательность, в которой один, несколько, например, два, три, четыре, пять, шесть, семь или более, включая все, нуклеотиды модифицированы такими модификациями, как 2'-ОМе, 2'-F, лиганд, линкер, модификация 3'-конца или 5'-конца или любая другая модификация. Это также относится к последовательностям, в которых два или более нуклеотида связаны друг с другом природной фосфодиэфирной связью или любой другой связью, такой как фосфотиоатная или фосфодитиоатная связь.

Двухцепочечная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, в которой первая цепь и вторая цепь гибридизуются друг с другом по меньшей мере на части своей длины и, следовательно, способны образовывать дуплексную область в физиологических условиях, таких как PBS при 37°C в концентрации 1 мкМ каждой цепи. Первая и вторая цепи предпочтительно способны гибридизоваться друг с другом и, следовательно, образовывать дуплексную область на участке по меньшей мере из 15 нуклеотидов, предпочтительно из 16, 17, 18 или 19 нуклеотидов. Эта дуплексная область включает спаривания нуклеотидных оснований между двумя цепями, предпочтительно на основе спаривания оснований Уотсона-Крика и/или неоднозначного спаривания оснований (например, спаривания оснований GU). Все нуклеотиды двух цепей в дуплексной области не должны образовывать пары оснований друг с другом для образования дуплексной области. Допускается определенное количество несовпадений, делеций или вставок между нуклеотидными последовательностями двух цепей. Также возможны липкие концы на любом конце первой или второй цепи или неспаренные нуклеотиды на любом конце двухцепочечной нуклеиновой кислоты. Двухцепочечная нуклеиновая кислота предпочтительно представляет собой стабильную двухцепочечную нуклеиновую кислоту в физиологических условиях и предпочтительно имеет температуру плавления (T<sub>m</sub>) 45°C или более, предпочтительно 50°C или более, и более предпочтительно 55°C или более, например, в PBS в концентрации 1 мкМ каждой цепи первая цепь и вторая цепь предпочтительно способны образовывать дуплексную область (т.е. комплементарны друг другу) на: i) по меньшей мере части их длины, предпочтительно более чем по 15 нуклеотидам по длине обеих, ii) по всей длине первой цепи, iii) по всей длине второй цепи и/или iv) по всей длине как первой, так и второй цепи. Если цепи комплементарны друг другу на определенной длине, это означает, что цепи могут образовывать пары оснований друг с другом, либо посредством спаривания Уотсона-Крика, либо путем неодно-

значного спаривания оснований на этой длине. Каждый нуклеотид по длине не обязательно должен быть способен образовывать пару оснований противоположным нуклеотидом в другой цепи по всей заданной длине, если в физиологических условиях может быть образован стабильный двухцепочечный нуклеотид. Однако это является предпочтительным.

Определенное количество несовпадений, делеций или вставок между первой (антисмысловой) цепью и последовательностью-мишенью или между первой цепью и второй (смысловой) цепью может быть допустимым применительно к мРНК и в некоторых случаях даже может увеличивать активность.

Под нуклеиновой кислотой подразумевают нуклеиновую кислоту, содержащую две цепи, содержащие нуклеотиды, которая способна препятствовать экспрессии генов. Ингибирование может быть полным или частичным и приводит к снижению экспрессии генов нацеленным образом. Нуклеиновая кислота содержит две отдельные полинуклеотидные цепи; первую цепь, которая также может быть направляющей цепью; и вторую цепь, которая также может быть пассажирской цепью. Первая цепь и вторая цепь могут быть частью одной и той же полинуклеотидной молекулы, которая является самокомплементарной и "складывается", разворачиваясь назад, с образованием двухцепочечной молекулы. Нуклеиновая кислота может представлять собой молекулу мРНК.

Нуклеиновая кислота может содержать рибонуклеотиды, модифицированные рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды или ненуклеотидные аналоги нуклеотидов, которые способны имитировать нуклеотиды так, что они могут "спариваться" с соответствующим основанием на последовательности-мишени или комплементарной цепи. Нуклеиновая кислота может дополнительно содержать двухцепочечную часть нуклеиновой кислоты или дуплексную область, образованную всей первой цепью или ее частью (также известной в данной области техники как направляющая цепь) и всей второй цепью или ее частью (также известной в данной области техники как пассажирская цепь). Дуплексная область определяется как область, начинающаяся с первой пары оснований, образованной между первой цепью и второй цепью, и заканчивающаяся последней парой оснований, образованной между первой цепью и второй цепью, включительно.

Под дуплексной областью подразумевают область в двух комплементарных или по существу комплементарных олигонуклеотидах, которые образуют пары оснований друг с другом, либо путем спаривания оснований по Уотсону-Крику, либо любым другим способом, который обеспечивает образование дуплекса между олигонуклеотидными цепями, которые являются комплементарными или по существу комплементарными. Например, олигонуклеотидная цепь, содержащая 21 нуклеотидный элемент, может спариваться с другим олигонуклеотидом из 21 нуклеотидного элемента, но только 19 нуклеотидов на каждой цепи являются комплементарными или по существу комплементарными так, что "дуплексная область" состоит из 19 пар оснований.

Оставшиеся пары оснований могут существовать в виде 5'- и 3'-липких концов или в виде одноцепочечных областей. Кроме того, в дуплексной области не требуется 100% комплементарность; в дуплексной области допустима существенная комплементарность. Существенная комплементарность относится к такой комплементарности между цепями, что они способны ренатурировать в биологических условиях. Методики, позволяющие эмпирически определить, способны ли две цепи ренатурировать в биологических условиях, хорошо известны в данной области техники. Согласно другому варианту две цепи могут быть синтезированы и добавлены вместе в биологических условиях, чтобы определить, ренатурируют ли они друг с другом.

Части первой цепи и второй цепи, которые образуют по меньшей мере одну дуплексную область, могут быть полностью комплементарны или по меньшей мере частично комплементарны друг другу.

В зависимости от длины нуклеиновой кислоты не обязательно требуется идеальное соответствие между первой цепью и второй цепью с точки зрения комплементарности оснований. Однако первая и вторая цепи должны быть способны гибридизоваться в физиологических условиях.

Комплементарность между первой цепью и второй цепью по меньшей мере в одной дуплексной области может быть идеальной в том, что в любой цепи отсутствуют несоответствия нуклеотидов или дополнительные/удаленные нуклеотиды. Согласно другому варианту комплементарность может быть неидеальной. Комплементарность может составлять от приблизительно 70% до приблизительно 100%. Более конкретно, комплементарность может составлять по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% и промежуточные значения.

Применительно к настоящему изобретению "часть", например, в "одной дуплексной области, которая содержит по меньшей мере часть первой цепи", следует понимать как то, что дуплексная область содержит по меньшей мере 10, предпочтительно по меньшей мере 12, более предпочтительно по меньшей мере 14, еще более предпочтительно по меньшей мере 16, даже более предпочтительно по меньшей мере 18 и наиболее предпочтительно все из нуклеотидов данной эталонной последовательности цепи. Часть эталонной последовательности в дуплексной области по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно на 100% идентична соответствующей части эталонной последовательности. Согласно другому варианту количество несоответствий отдельных нуклеотидов относительно части эталонной последовательности составляет не более трех, предпочтительно не

более двух, более предпочтительно не более одного и наиболее предпочтительно ноль.

Первая цепь и вторая цепь могут каждая содержать область комплементарности, которая содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающуюся не более чем 3 нуклеотидами от любой из последовательностей, перечисленных в табл. 1.

Применение нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением включает образование дуплексной области между всей первой цепью или ее частью и частью нуклеиновой кислоты-мишени. Часть нуклеиновой кислоты-мишени, которая образует дуплексную область с первой цепью, определяемую как область, которая начинается с первой пары оснований, образованной между первой цепью и последовательностью-мишенью, и заканчивается последней парой оснований, образованной между первой цепью и последовательностью-мишенью, включительно, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты-мишени или просто последовательность-мишень. Дуплексная область, образованная между первой цепью и второй цепью, необязательно должна быть аналогична дуплексной области, образованной между первой цепью и последовательностью-мишенью. Это означает, что вторая цепь может иметь последовательность, отличающуюся от последовательности-мишени; однако первая цепь должна быть способна образовывать дуплексную структуру с обеими второй цепью и последовательностью-мишенью, по меньшей мере в физиологических условиях.

Комплементарность между первой цепью и последовательностью-мишенью может быть идеальной (в каждой нуклеиновой кислоте отсутствуют несовпадения нуклеотидов или дополнительные/удаленные нуклеотиды).

Комплементарность между первой цепью и последовательностью-мишенью может быть неидеальной. Комплементарность может составлять от приблизительно 70% до приблизительно 100%. Более конкретно, комплементарность может составлять по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90% или 95% и промежуточные значения.

Идентичность между первой цепью и комплементарной последовательностью последовательности-мишени может варьироваться от приблизительно 75% до приблизительно 100%. Более конкретно, комплементарность может составлять по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90% или 95% и промежуточные значения, при условии, что нуклеиновая кислота способна уменьшать или ингибировать экспрессию LPA.

Нуклеиновая кислота, имеющая менее чем 100% комплементарность между первой цепью и последовательностью-мишенью, может быть способна уменьшить экспрессию LPA до того же уровня, как и нуклеиновая кислота, имеющая идеальную комплементарность между первой цепью и последовательностью-мишенью. Согласно другому варианту она может быть способна уменьшить экспрессию LPA до уровня, который составляет 15-100% от уровня уменьшения, достигнутого с помощью нуклеиновой кислоты с идеальной комплементарностью.

В одном аспекте нуклеиновая кислота включает первую цепь нуклеиновой кислоты и вторую цепь нуклеиновой кислоты, причем первая цепь способна гибридизоваться в физиологических условиях с нуклеиновой кислотой последовательности SEQ ID NO: 10, 6, 2, 4, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 или 44;

где вторая цепь способна гибридизоваться в физиологических условиях с первой цепью с образованием дуплексной области; и

где нуклеотиды в положениях 2 и 14 от 5'-конца первой цепи модифицированы 2'-фтор модификацией, и нуклеотиды на второй цепи, которые соответствуют положениям 11-13 первой цепи, модифицированы 2'-фтор модификацией.

Нуклеиновые кислоты, способные к гибридизации в физиологических условиях, представляют собой нуклеиновые кислоты, которые способны образовывать пары оснований, предпочтительно пары оснований Уотсона-Крика или неоднозначные пары оснований, по меньшей мере между частью противоположных нуклеотидов в цепях, с образованием по меньшей мере дуплексной области. Такая двухцепочечная нуклеиновая кислота предпочтительно представляет собой стабильную двухцепочечную нуклеиновую кислоту в физиологических условиях (например, в PBS при 37°C в концентрации 1 мкМ каждой цепи), что означает, что в таких условиях две цепи остаются гибридизованными друг с другом. Tm двухцепочечного нуклеотида предпочтительно составляет 45°C или более, предпочтительно 50°C или более и более предпочтительно 55°C или более.

Один аспект относится к нуклеиновой кислоте для ингибирования экспрессии LPA, где нуклеиновая кислота содержит первую последовательность из по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 16, более предпочтительно по меньшей мере 17, еще более предпочтительно по меньшей мере 18 и наиболее предпочтительно всех нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида, предпочтительно не более чем на 2 нуклеотида, более предпочтительно не более чем на 1 нуклеотид и наиболее предпочтительно не отличающиеся ни одним нуклеотидом от любой из последовательностей табл. 1, причем первая последовательность способна гибридизоваться с транскриптом целевого гена (например, мРНК) в физиологических условиях. Предпочтительно нуклеиновая кислота дополнительно содержит вторую последовательность из по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 16, более предпочтительно по меньшей мере 17, еще более предпочтительно по меньшей мере 18 и наиболее предпочтительно всех нуклеотидов, различающихся не более чем на 3 нуклеотида, предпочтительно не более чем

на 2 нуклеотида, более предпочтительно не более чем на 1 нуклеотид и наиболее предпочтительно не отличающуюся ни одним нуклеотидом от любой из последовательностей табл. 1, причем вторая последовательность способна гибридизоваться с первой последовательностью в физиологических условиях, и предпочтительно нуклеиновая кислота представляет собой миРНК, способную ингибировать экспрессию LPA через путь РНКи.

Описанные в настоящем документе нуклеиновые кислоты могут ингибировать экспрессию LPA. Ингибирование может быть полным, т.е. 0% остаточной экспрессии по сравнению с уровнем экспрессии LPA в отсутствие нуклеиновой кислоты согласно изобретению. Ингибирование экспрессии LPA может быть частичным, то есть может составлять 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или промежуточные значения экспрессии LPA в отсутствие нуклеиновой кислоты согласно изобретению. Уровень ингибирования может быть измерен путем сравнения обработанного образца с необработанным образцом или с образцом, обработанным контролем, таким как, например, миРНК, которая не нацелена на LPA. Ингибирование можно измерить путем измерения уровней мРНК и/или белка LPA или уровней биомаркера или индикатора, который коррелирует с присутствием или активностью LPA. Его можно измерить в клетках, которые могли быть обработаны *in vitro* описанной в настоящем документе нуклеиновой кислотой. В качестве альтернативы или в дополнение, ингибирование может быть измерено в клетках, таких как гепатоциты, или в ткани, такой как ткань печени, или в органе, таком как печень, или в жидкости организма, такой как кровь, сыворотка, лимфа, или любой другой части организма, которая была взята у субъекта, ранее получавшего лечение нуклеиновой кислотой, описанной в настоящем документе. Предпочтительно ингибирование экспрессии LPA определяется путем сравнения уровня мРНК LPA, измеренного в LPA-экспрессирующих клетках после 24 или 48 часов обработки *in vitro* в идеальных условиях (см. примеры для соответствующих концентраций и условий) нуклеиновой кислотой, описанной в настоящем документе, с уровнем мРНК LPA, измеренным в тех же клетках без обработки или с имитацией обработки или с обработкой контрольной нуклеиновой кислотой.

В настоящей заявке термин "ингибировать", "подавлять" или "уменьшать" в отношении экспрессии гена означает, что экспрессия гена или уровень молекул РНК или эквивалентных молекул РНК, кодирующих один или более белков или субъединиц белков (например, мРНК), или активность одного или более белков или субъединиц белков уменьшается ниже уровня, наблюдаемого в отсутствие нуклеиновой кислоты или конъюгированной нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, или по отношению к молекуле миРНК без известной гомологии с транскриптами человека (в настоящей заявке называется подавляющий контроль). Такой контроль может быть конъюгирован и модифицирован аналогичным образом, как и молекула согласно настоящему изобретению, и доставлен в клетку-мишень аналогичным путем; например, экспрессия может уменьшиться до 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15% или до промежуточных значений, или до меньшего значения, чем то, которое наблюдается в отсутствие нуклеиновой кислоты или конъюгированной нуклеиновой кислоты или в присутствии подавляющего контроля.

Нуклеиновая кислота может содержать первую цепь и вторую цепь, каждая из которых содержит 19-25 нуклеотидов в длину. Первая цепь и вторая цепь могут иметь разную длину.

Первая цепь и/или вторая цепь каждая может быть 17-35, предпочтительно 18-30, более предпочтительно 19-25 и наиболее предпочтительно 19 нуклеотидов в длину, и по меньшей мере одна дуплексная область может быть 10-25 нуклеотидов, предпочтительно 18-23 нуклеотидов в длину. Дуплекс может содержать две отдельные цепи или может содержать одну цепь, которая включает первую цепь и вторую цепь.

Первая цепь может иметь длину 17-25 нуклеотидов, предпочтительно она может иметь длину 18-24 нуклеотидов, она может иметь длину 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотида. Наиболее предпочтительно первая цепь имеет длину 19 нуклеотидов. Вторая цепь может независимо иметь длину 17-25 нуклеотидов, предпочтительно, она может иметь длину 18-24 нуклеотида, она может иметь длину 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотида. Более предпочтительно, длина второй цепи составляет 18 или 19 нуклеотидов, и наиболее предпочтительно она имеет длину 18 нуклеотидов.

Нуклеиновая кислота может иметь длину 15-25 пар нуклеотидов. Нуклеиновая кислота может иметь длину 17-23 пары нуклеотидов. Нуклеиновая кислота может иметь длину 17-25 пар нуклеотидов. Нуклеиновая кислота может иметь длину 23-24 пары нуклеотидов. Нуклеиновая кислота может иметь длину 19-21 пар нуклеотидов. Нуклеиновая кислота может иметь длину 21-23 пары нуклеотидов.

Нуклеиновая кислота может содержать дуплексную область, которая состоит из 19-25 пар нуклеотидных оснований. Дуплексная область может состоять из 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 пар оснований, которые могут быть смежными. Предпочтительно, дуплексная область состоит из 19 пар оснований.

Предпочтительно нуклеиновая кислота опосредует РНК-интерференцию.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота для ингибирования экспрессии LPA в клетке содержит по меньшей мере одну дуплексную область, которая содержит первую цепь и вторую цепь, которая по меньшей мере частично комплементарна первой цепи, причем указанная первая цепь содержит последовательность из по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 16, более предпочтительно по меньшей мере 17, еще более предпочтительно по меньшей



мере 18 и наиболее предпочтительно по меньшей мере 19 нуклеотидов, при этом последовательность по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно на 100% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 9, 5, 1, 3, 7, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 или 43.

Согласно дополнительному аспекту описанная нуклеиновая кислота или конъюгированная нуклеиновая кислота может уменьшать экспрессию LPA по меньшей мере на 15% по сравнению с экспрессией, наблюдаемой в отсутствие нуклеиновой кислоты или конъюгированной нуклеиновой кислоты. Все предпочтительные признаки любого из предыдущих аспектов также применимы к этому аспекту. В частности, экспрессия LPA может быть уменьшена по меньшей мере до следующих заданных процентных значений (%) или до менее чем 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15% или менее и промежуточных значений относительно экспрессии, которая наблюдалась в отсутствие нуклеиновой кислоты или конъюгированной нуклеиновой кислоты или в присутствии подавляющего контроля.

Нуклеиновая кислота может содержать липкий конец на одном конце и тупой конец на другом. Нуклеиновая кислота может содержать липкий конец на обоих концах. Нуклеиновая кислота может содержать тупые концы на обоих концах. Нуклеиновая кислота может иметь тупой конец на конце с 5'-концом первой цепи и 3'-концом второй цепи или на 3'-конце первой цепи и 5'-конце второй цепи.

В настоящей заявке "липкий конец ("overhang")" имеет свое обычное и принятое значение в данной области техники, т.е. одноцепочечная часть нуклеиновой кислоты, которая простирается за пределы концевого нуклеотида комплементарной цепи в двухцепочечной нуклеиновой кислоте. Термин "тупой конец" включает двухцепочечную нуклеиновую кислоту, в которой обе цепи оканчиваются в одном и том же положении, независимо от того, спарен(ы) ли концевой(ые) нуклеотид(ы). Концевой нуклеотид первой цепи и второй цепи на тупом конце может быть спаренным. Концевой нуклеотид первой цепи и второй цепи на тупом конце может быть неспаренным. Два концевых нуклеотида первой цепи и второй цепи на тупом конце могут быть спаренными. Два концевых нуклеотида первой цепи и второй цепи на тупом конце могут быть неспаренными.

Нуклеиновая кислота может содержать липкий конец на 3'- или 5'-конце. Нуклеиновая кислота может содержать 3'-липкий конец на первой цепи. Нуклеиновая кислота может содержать 3'-липкий конец на второй цепи. Нуклеиновая кислота может содержать 5'-липкий конец на первой цепи. Нуклеиновая кислота может содержать 5'-липкий конец на второй цепи. Нуклеиновая кислота может содержать липкий конец как на 5'-конце, так и на 3'-конце первой цепи. Нуклеиновая кислота может содержать липкий конец как на 5'-конце, так и на 3'-конце второй цепи. Нуклеиновая кислота может содержать 5'-липкий конец на первой цепи и 3'-липкий конец на второй цепи. Нуклеиновая кислота может содержать 3'-липкий конец на первой цепи и 5'-липкий конец на второй цепи. Нуклеиновая кислота может содержать 3'-липкий конец на первой цепи и 3'-липкий конец на второй цепи. Нуклеиновая кислота может содержать 5'-липкий конец на первой цепи и 5'-липкий конец на второй цепи.

Липкий конец на 3'-конце или 5'-конце второй цепи или первой цепи может быть выбран из 1, 2, 3, 4 и 5 нуклеотидов в длину. Необязательно липкий конец может состоять из 1 или 2 нуклеотидов, которые могут быть или не быть модифицированы.

Предпочтительно нуклеиновая кислота представляет собой миРНК. МиРНК представляют собой короткие интерферирующие или короткие подавляющие РНК, которые способны ингибировать экспрессию целевого гена через путь РНК-интерференции (РНКи). Ингибирование происходит посредством направленной деградации транскриптов мРНК целевого гена после транскрипции. МиРНК является частью комплекса RISC. Комплекс RISC специфически нацелен на РНК-мишень за счет комплементарности последовательности первой (антисмысловой) цепи с последовательностью-мишенью.

Предпочтительно нуклеиновая кислота опосредует РНК-интерференцию (РНКи). Следовательно, нуклеиновая кислота или по меньшей мере первая цепь нуклеиновой кислоты предпочтительно может быть включена в комплекс RISC. В результате нуклеиновая кислота или по меньшей мере первая цепь нуклеиновой кислоты, следовательно, способна направлять комплекс RISC к конкретной РНК-мишени, с которой нуклеиновая кислота или по меньшей мере первая цепь нуклеиновой кислоты по меньшей мере частично комплементарна. Затем комплекс RISC специфически расщепляет эту РНК-мишень и в результате приводит к ингибированию экспрессии гена, из которого происходит РНК.

#### **Модификации нуклеиновой кислоты**

Немодифицированные полинуклеотиды, в частности рибонуклеотиды, могут быть подвержены разрушению клеточными нуклеазами, и, как таковые, модификации/модифицированные нуклеотиды могут быть включены в нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению. Такие модификации могут помочь стабилизировать нуклеиновую кислоту, делая ее более устойчивой к нуклеазам. Улучшенная устойчивость обеспечивает активность нуклеиновых кислот в качестве посредников РНК-интерференции в течение более длительных периодов времени и особенно желательна, если нуклеиновые кислоты должны применяться для лечения.

Модификации нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению обычно обеспечивают эффективный инструмент для преодоления потенциальных ограничений, включая, но не ограничиваясь

этим, стабильность и биодоступность в условиях *in vitro* и в условиях *in vivo*, присущие природным молекулам РНК. Нуклеиновая кислота в соответствии с настоящим изобретением может быть модифицирована с помощью химических модификаций. Модифицированная нуклеиновая кислота также может свести к минимуму возможность индукции активности интерферона у человека. Модификация может дополнительно усиливать функциональную доставку нуклеиновой кислоты к клетке-мишени. Модифицированная нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению может содержать один или более химически модифицированных рибонуклеотидов любой или обеих из первой цепи или второй цепи. Рибонуклеотид может содержать химическую модификацию основания, сахара или фосфатных групп. Рибонуклеиновая кислота может быть модифицирована путем замены или вставки аналогов нуклеиновых кислот или оснований.

Предпочтительно, по меньшей мере один нуклеотид первой и/или второй цепи нуклеиновой кислоты представляет собой модифицированный нуклеотид, предпочтительно не встречающийся в природе нуклеотид, такой как предпочтительно 2'-F модифицированный нуклеотид.

Один или более нуклеотидов нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению могут быть модифицированы. Нуклеиновая кислота может содержать по меньшей мере один модифицированный нуклеотид. Модифицированный нуклеотид может находиться в первой цепи. Модифицированный нуклеотид может находиться во второй цепи. Модифицированный нуклеотид может находиться в дуплексной области.

Модифицированный нуклеотид может находиться вне дуплексной области, т.е. в одноцепочечной области. Модифицированный нуклеотид может находиться на первой цепи и может находиться за пределами дуплексной области. Модифицированный нуклеотид может находиться на второй цепи и может находиться за пределами дуплексной области. 3'-концевой нуклеотид первой цепи может представлять собой модифицированный нуклеотид. 3'-концевой нуклеотид второй цепи может представлять собой модифицированный нуклеотид. 5'-концевой нуклеотид первой цепи может представлять собой модифицированный нуклеотид. 5'-концевой нуклеотид второй цепи может представлять собой модифицированный нуклеотид.

Нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению может содержать 1 модифицированный нуклеотид или нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению может содержать приблизительно 2-4 модифицированных нуклеотида, или нуклеиновая кислота может содержать приблизительно 4-6 модифицированных нуклеотидов, приблизительно 6-8 модифицированных нуклеотидов, приблизительно 8-10 модифицированных нуклеотидов, приблизительно 10-12 модифицированных нуклеотидов, приблизительно 12-14 модифицированных нуклеотидов, приблизительно 14-16 модифицированных нуклеотидов, приблизительно 16-18 модифицированных нуклеотидов, приблизительно 18-20 модифицированных нуклеотидов, приблизительно 20-22 модифицированных нуклеотида, приблизительно 22-24 модифицированных нуклеотида, 24-26 модифицированных нуклеотидов или приблизительно 26-28 модифицированных нуклеотидов или все нуклеотиды могут быть модифицированы. В каждом случае нуклеиновая кислота, содержащая указанные модифицированные нуклеотиды, сохраняет по меньшей мере 50% своей активности по сравнению с этой же нуклеиновой кислотой, но без указанных модифицированных нуклеотидов или наоборот. Нуклеиновая кислота может сохранять 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%, включая промежуточные значения, своей активности по сравнению с этой же нуклеиновой кислотой, но без указанных модифицированных нуклеотидов, или может иметь более 100% активности этой же нуклеиновой кислоты без указанных модифицированных нуклеотидов.

Модифицированный нуклеотид может представлять собой пурин или пиримидин. По меньшей мере половина пуринов может быть модифицирована. По меньшей мере половина пиримидинов может быть модифицирована. Все из пуринов могут быть модифицированы. Все из пиримидинов могут быть модифицированы. Модифицированные нуклеотиды могут быть выбраны из группы, состоящей из 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-O-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, закрытого нуклеотида, лишённого азотистого основания нуклеотида, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолино-нуклеотида, фосфоамидата, содержащего неприродное основание нуклеотида, нуклеотида, содержащего 5'-фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, и концевого нуклеотида, соединённого с производным холестерина или группой бисдециламида додекановой кислоты.

Нуклеиновая кислота может содержать нуклеотид, содержащий модифицированный нуклеотид, причем основание выбрано из 2-аминоаденозина, 2,6-диаминопурина, инозина, пиридин-4-она, пиридин-2-она, фенила, псевдоурацила, 2,4,6-триметоксибензола, 3-метилурацила, дигидроуридина, нафтила, аминифенила, 5-алкилцитидина (например, 5-метилцитидина), 5-алкилуридина (например, риботимидина), 5-галоуридина (например, 5-бромуридина), 6-азапиримидина, 6-алкилпиримидина (например, 6-метилуридина), пропина, квеуозина, 2-тиоуридина, 4-тиоуридина, вайбутокозина, 4-ацетилцитидина, 5-(карбоксихидроксиметил)уридина, 5'-карбоксиметиллаинометил-2-тиоуридина, 5-карбоксиметиллаинометилуридина, бета-D-галактозилквеуозина, 1-метиладенозина, 1-метилюридина, 2,2-диметилгуанозина, 3-метилцитидина, 2-метиладенозина, 2-метилгуанозина, N6-метиладенозина, 7-

метилгуанозина, 5-метоксиаминометил-2-тиоуридина, 5-метиламинометилуридина, 5-метилкарбонилметилуридина, 5-метилоксиуридина, 5-метил-2-тиоуридина, 2-метилтио-N-6-изопентениладенозина, бета-D-маннозилквеуозина, уридин-5-оксиуксусной кислоты и 2-тиоцитидина.

Нуклеиновые кислоты, обсуждаемые в настоящей заявке, включают немодифицированную РНК, а также РНК, которая была модифицирована, например, для улучшения эффективности, и полимеры нуклеозидных суррогатов. Немодифицированная РНК относится к молекуле, в которой компоненты нуклеиновой кислоты, а именно сахара, основания и фосфатные группы, являются такими же или по существу такими же, как и те, которые встречаются в природе, например, которые встречаются в природе в организме человека. В настоящей заявке модифицированный нуклеотид относится к нуклеотиду, в котором один или более из компонентов нуклеотидов, а именно сахара, основания и фосфатные группы, отличаются от тех, которые встречаются в природе. Несмотря на то что модифицированные нуклеотиды так называются из-за своей модификации, термин также включает молекулы, которые не являются нуклеотидами, например, полинуклеотидную молекулу, в которой рибофосфатный остов заменен нерибофосфатной конструкцией, которая обеспечивает гибридизацию между цепями, т.е. модифицированные нуклеотиды имитируют рибофосфатный остов.

Многие из описанных ниже модификаций, которые встречаются в нуклеиновой кислоте, будут повторены в полинуклеотидной молекуле, например, модификация основания или фосфатной группы, или несоединяющего О из фосфатной группы. В некоторых случаях модификация будет встречаться во всех из возможных положений/нуклеотидов в полинуклеотиде, но во многих случаях не будет встречаться. Модификация может встречаться только в 3'- или 5'-концевом положении, может встречаться только в концевых областях, например, в положении на концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи. Модификация может встречаться в двухцепочечной области, одноцепочечной области или в обеих. Модификация может встречаться только в двухцепочечной области нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению или может встречаться только в одноцепочечной области нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. Фосфотиоатная модификация в положении несоединяющего О 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 или 5 нуклеотидах или может встречаться в дуплексе и/или в одноцепочечных областях, в частности, на концах. 5'-Конец или 3'-конец могут быть фосфорилированы.

Стабильность нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может быть повышена путем включения конкретных оснований в липких концах или включения модифицированных нуклеотидов, в одноцепочечных липких концах, например, в 5'- или 3'-липком конце или в обоих. В липкие концы могут быть включены пуриновые нуклеотиды. Все или некоторые из оснований в 3'- или 5'-липком конце могут быть модифицированы. Модификации могут включать применение модификаций в группе 2'-ОН рибозного сахара, применение дезоксирибонуклеотидов вместо рибонуклеотидов и модификации в фосфатной группе, такие как фосфотиоатные модификации. Липкие концы необязательно должны быть гомологичны последовательности-мишени.

Нуклеазы могут гидролизовать фосфодиэфирные связи нуклеиновых кислот. Однако химические модификации нуклеиновых кислот могут придавать улучшенные свойства и могут сделать олигорибонуклеотиды более устойчивыми к нуклеазам.

В настоящей заявке модифицированные нуклеиновые кислоты могут включать одно или более из следующего:

- (i) изменение, например, замещение одного или обоих из несоединяющих атомов кислорода фосфата и/или одного или более из соединяющих атомов кислорода фосфата (упоминается как событие соединения, даже если происходит на 5'- и 3'-конце нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению);
- (ii) изменение, например, замещение компонента рибозного сахара, например, 2'-гидроксила на рибозном сахаре;
- (iii) замещение фосфатной группы "дефосфо" линкерами;
- (iv) модификация или замещение природного основания;
- (v) замещение или модификация рибозофосфатного остова;
- (vi) модификация 3'-конца или 5'-конца РНК, например, удаление, модификация или замещение концевой фосфатной группы или конъюгация группы, например, флуоресцентномеченой группы, с 3'- или 5'-концом РНК.

Термины замещение, модификация, изменение указывают на отличие от природной молекулы.

Конкретные модификации более подробно обсуждаются ниже.

Примеры модифицированных фосфатных групп включают фосфотиоат, фосфоселенаты, боранофосфаты, сложные эфиры боранофосфата, фосфонаты водорода, фосфоамидаты, алкил или арилфосфонаты и фосфотриэфиры. В фосфодитиоатах оба несоединяющих атома кислорода замещены серой. Один, каждый или оба несоединяющих атома кислорода в фосфатной группе могут быть независимо замещены любым из S, Se, В, С, Н, N или OR (R представляет собой алкил или арил).

Фосфатный линкер также можно модифицировать путем замещения соединяющего атома кислорода азотом (мостиковые фосфоамидаты), серой (мостиковые фосфотиоаты) и углеродом (мостиковые ме-

тиленфосфонаты). Замещение может происходить у концевой кислорода. Возможно замещение несоединяющихся атомов кислорода азотом.

Модифицированный нуклеотид может содержать модификацию сахарных групп. 2'-гидроксильная группа (ОН) может быть модифицирована или замещена рядом различных "окси" или "дезоксид" заместителей.

Примеры модификаций "окси"-2'-гидроксильной группой включают алкокси или арилокси (OR, например, R=H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар); полиэтиленгликоли (ПЭГ),  $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ ; "закрытые" нуклеиновые кислоты (LNA), в которых 2'-гидроксил соединен, например, метиленовым мостиком, с 4'-углеродом этого же рибозного сахара; O-АМИН (АМИН=NH<sub>2</sub>; алкиламино, диалкиламино, гетероциклический, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин, полиамино) и аминокалкокси,  $O(CH_2)_n$ -АМИН, (например, АМИН=NH<sub>2</sub>; алкиламино, диалкиламино, гетероциклический, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин, полиамино).

"Дезокси" модификации включают водород, галоген, амино (например, NH<sub>2</sub>; алкиламино, диалкиламино, гетероциклический, ариламино, диариламино, гетероариламино, дигетероариламино или аминокислоту);  $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$ -АМИН (АМИН=NH<sub>2</sub>; алкиламино, диалкиламино, гетероциклический, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино), -NHC(O)R (R=алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар), циано; меркапто; алкил-тио-алкил; тиоалкокси; и алкил, циклоалкил, арил, алкенил и алкинил, которые могут быть необязательно замещены, например, функциональной аминогруппой. Другие заместители из определенных вариантов реализации включают 2'-метоксиэтил, 2'-OCH<sub>3</sub>, 2'-O-аллил, 2'-C-аллил и 2'-фтор. Сахарная группа также может содержать один или более атомов углерода, которые имеют стереохимическую конфигурацию, противоположную той, которая имеется у соответствующего углерода в рибозе. Таким образом, модифицированный нуклеотид может содержать сахар, такой как арабиноза.

Модифицированные нуклеотиды также могут содержать "лишенные азотистого основания" сахара, в которых отсутствует нуклеиновое основание у C-1'. Эти лишенные азотистого основания сахара могут дополнительно содержать модификации у одного или более атомов, составляющих сахар.

2'-модификации можно применять в комбинации с одной или более модификациями фосфатного линкера (например, фосфотиоат).

Фосфатные группы могут быть индивидуально замещены соединителями, не содержащими фосфор.

Примеры групп, которые могут замещать фосфатную группу, включают силоксан, карбонат, карбоксиметил, карбамат, амид, простой тиозфир, этиленоксидный линкер, сульфат, сульфонамид, тиоформацеталь, формацеталь, оксим, метиленимино, метиленметилено, метиленигидразо, метилендиметилгидразо и метиленоксиметилено. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения замещения могут включать метиленкарбониламино- и метиленметиленогруппы.

Фосфатный линкер и рибозный сахар могут быть замещены устойчивыми к нуклеазе нуклеотидами.

Примеры включают такие суррогаты нуклеозидов как морфолино, циклобутил, пирролидин и пептидная нуклеиновая кислота (ПНК). В определенных вариантах реализации могут применяться ПНК-суррогаты.

3'- и 5'-концы олигонуклеотида могут быть модифицированы. Такие модификации могут быть на 3'-конце или 5'-конце или на обоих концах молекулы. Они могут включать модификацию или замещение всего концевой фосфата или одного или более атомов фосфатной группы. Например, 3'- и 5'-концы олигонуклеотида могут быть конъюгированы с другими функциональными молекулярными группами, такими как группы, представляющие собой метки, например, флуорофоры (например, пирен, TAMRA, флуоресцеин, красители Cy3 или Cy5), или защитные группы (например, на основе серы, кремния, бора или сложного эфира). Функциональные молекулярные группы могут быть присоединены к сахару за счет фосфатной группы и/или линкера. Концевой атом линкера может соединяться или замещать соединяющий атом фосфатной группы или C-3' или C-5' O, N, S или C группы сахара. Согласно другому варианту линкер может соединяться с концевым атомом суррогата нуклеотида (например, ПНК) или замещать его. Эти спейсеры или линкеры могут включать, например,  $-(CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2)_nN-$ ,  $-(CH_2)_nO-$ ,  $-(CH_2)_nS-$ ,  $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2O-$  (например, n=3 или 6), лишенные азотистого основания сахара, амид, карбокси, амин, оксамин, оксимин, тиозфир, дисульфид, тиомочевину, сульфонамид или морфолино, или биотин и флуоресцеиновые реагенты. 3'-конец может представлять собой группу -ОН.

Другие примеры концевых модификаций включают красители, интеркалирующие агенты (например, акридины), сшивающие агенты (например, псорален, митомицин С), порфирины (ТРРС4, тексафин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы, ЭДТА, липофильные носители (например, холестерин, желчную кислоту, адамантануксусную 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, ОЗ-(олеоил)лихолевую кислоту, ОЗ-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситрилит или феноксазин) и пептидные конъюгаты (например, пептид Antennapedia, пептид Tat), алкилирующие агенты, фосфат, амино,

меркапто, ПЭГ (например, ПЭГ-40К), MPEG, [MPEG]<sub>2</sub>, полиамино, алкил, замещенный алкил, радиомеченные маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), стимуляторы транспорта/абсорбции (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, кластеры имидазола, конъюгаты акридин-имидазол, комплексы Eu<sup>3+</sup> и тетраазамакроцикло).

Концевые модификации могут быть добавлены по ряду причин, включая модуляцию активности или модуляцию устойчивости к разрушению. Концевые модификации, которые можно применять для модулирования активности, включают модификацию 5'-конца фосфатом или аналогами фосфата. Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению могут быть 5'-фосфорилированы на первой или второй цепях или могут содержать фосфорильный аналог на 5'-конце. Модификации 5'-фосфатом включают модификации, которые совместимы с RISC-опосредуемым подавлением генов. Подходящие модификации включают: 5'-монофосфат ((HO)<sub>2</sub>(O)P-O-5'); 5'-дифосфат ((HO)<sub>2</sub>(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-трифосфат ((HO)<sub>2</sub>(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-гуанозиновый кэп (7-метилированный или неметилированный) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-аденозиновый кэп (Arpp) и любую кэп-структуру модифицированного или немодифицированного нуклеотида (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-монотиофосфат (фосфотиоат; (HO)<sub>2</sub>(S)P-O-5'); 5'-монодитиофосфат (фосфодитиоат; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-фосфотиолат ((HO)<sub>2</sub>(O)P-S-5'); любую дополнительную комбинацию монофосфата, дифосфата и трифосфатов, в которых кислород замещен серой (например, 5'-альфа-тиотрифосфат, 5'-гамма-тиотрифосфат и т.д.), 5'-фосфоамидаты ((HO)<sub>2</sub>(O)P-NH-5', (HO)(NH<sub>2</sub>)(O)P-O-5'), 5'-алкилфосфонаты (R=алкил=метил, этил, изопропил, пропил и т.д., например, RP(OH)(O)-O-5', (OH)<sub>2</sub>(O)P-5'-CH<sub>2</sub>-), 5'-винилфосфонат, 5'-алкилэфирфосфонаты (R=алкилэфир=метоксиметил (MeOCH<sub>2</sub>-), этоксиметил и т.д., например, RP(OH)(O)-O-5'-).

Концевые модификации также можно применять для мониторинга распределения, и в таких случаях группы, которые будут добавлены, могут включать флуорофоры, например, флуоресцеин или краситель Alexa. Концевые модификации также можно применять для усиления поглощения, подходящие для этого модификации включают холестерин. Концевые модификации также можно применять для попеременной сшивки РНК-агента с другой группой.

Аденин, гуанин, цитозин и урацил являются наиболее распространенными основаниями, обнаруженными в РНК. Эти основания могут быть модифицированы или замещены для обеспечения РНК, имеющих улучшенные свойства. Например, устойчивые к нуклеазе олигорибонуклеотиды могут быть получены с применением этих оснований или синтетических и природных нуклеиновых оснований (например, инозина, тимина, ксантина, гипоксантина, нубуларина, изогуанидина или туберцидина) и любой одной из указанных выше модификаций. Согласно другому варианту можно применять замещенные или модифицированные аналоги любого из вышеуказанных оснований и "универсальных оснований". Примеры включают 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 5-галоурацил и цитозин, 5-пропинилурацил и цитозин, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 5-галоурацил, 5-(2-аминопропил)урацил, 5-аминоаллилурацил, 8-галоген, amino, тиол, тиоалкил, гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин, 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6-замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин, дигидроурацил, 3-деза-5-азацитозин, 2-аминопурин, 5-алкилурацил, 7-алкилгуанин, 5-алкилцитозин, 7-дезааденин, N<sub>6</sub>,N<sub>6</sub>-диметиладенин, 2,6-диаминопурин, 5-аминоаллилурацил, N<sub>3</sub>-метилурацил, замещенные 1,2,4-триазолы, 2-пиридинон, 5-нитроиндол, 3-нитропиррол, 5-метоксиурацил, урацил-5-оксиуксусную кислоту, 5-метоксикарбонилметилурацил, 5-метил-2-тиоурацил, 5-метоксикарбонилметил-2-тиоурацил, 5-метиламинометил-2-тиоурацил, 3-(3-амино-3-карбоксыпропил)урацил, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N<4>-ацетилцитозин, 2-тиоцитозин, N<sub>6</sub>-метиладенин, N<sub>6</sub>-изопентиладенин, 2-метилтио-N<sub>6</sub>-изопентиладенин, N-метилгуанины или O-алкилированные основания.

В настоящей заявке термин "неспаривающийся аналог нуклеотида" означает аналог нуклеотида, который содержит неспаривающуюся с основанием группу, включая, но не ограничиваясь ими: 6-дезаминоаденозин (небуларин), 4-Ме-индол, 3-нитропиррол, 5-нитроиндол, Ds, Pa, N<sub>3</sub>-Ме-рибо-U, N<sub>3</sub>-Ме-рибо-T, N<sub>3</sub>-Ме dC, N<sub>3</sub>-Ме-dT, N<sub>1</sub>-Ме-dG, N<sub>1</sub>-Ме-dA, N<sub>3</sub>-этил-dC, N<sub>3</sub>-Ме dC. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения неспаривающийся с основанием аналог нуклеотида представляет собой рибонуклеотид. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения он представляет собой дезоксирибонуклеотид.

В настоящей заявке термин "концевая функциональная группа" включает, но не ограничивается ими, галогеновые, спиртовые, аминные, карбоновые, сложноэфирные, амидные, альдегидные, кетоновые, простые эфирные группы.

Определенные группы могут быть соединены с 5'-концом первой цепи или второй цепи. Они включают лишенную азотистого основания рибозную группу, лишенную азотистого основания дезоксирибозную группу, модификации лишенного азотистого основания рибозной группы и лишенной азотистого основания дезоксирибозной группы, включая 2'-алкильные модификации; инвертированные лишенные

азотистого основания рибозные группы и лишённые азотистого основания дезоксирибозные группы и их модификации, Сб-имино-Рi; зеркальный нуклеотид, включая L-ДНК и L-РНК; 5'-ОМе-нуклеотид; и аналоги нуклеотидов, включая 4',5'-метилнуклеотид; 1-β-D-эритрофуранозилнуклеотид; 4'-тионуклеотид, карбоциклический нуклеотид; 5'-аминоалкилфосфат; 1,3-диамино-2-пропилфосфат, 3-аминопропилфосфат; 6-аминогексилфосфат; 12-аминододецилфосфат; гидроксипропилфосфат; 1,5-ангидрогекситолнуклеотид; альфа-нуклеотид; треопентофуранозилнуклеотид; ациклический 3',4'-секонуклеотид; 3,4-дигидроксибутилнуклеотид; 3,5-дигидроксипентилнуклеотид, 5'-5'-инвертированная лишённая азотистого основания группа; 1,4-бутандиолфосфат; 5'-амино; и мостиковые или немостиковые метилфосфонатные и 5'-меркапто группы.

Нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению может содержать лишённый азотистого основания нуклеотид. В настоящей заявке термин "лишённый азотистого основания" относится к группам, не содержащим основание или имеющим другие химические группы вместо основания в положении 1', например, 3',3'-соединенное или 5',5'-соединенное производное лишённой азотистого основания дезоксирибозы.

Нуклеиновая кислота может содержать один или более нуклеотидов на второй и/или первой цепях, которые модифицированы. Чередующиеся нуклеотиды могут быть модифицированы с образованием модифицированных нуклеотидов.

Чередование, описанное в настоящей заявке, означает, что оно происходит один за другим на регулярной основе. Другими словами, чередование означает повторение по очереди. Например, если один нуклеотид модифицирован, следующий смежный нуклеотид не модифицирован, а следующий смежный нуклеотид модифицирован и так далее. Один нуклеотид может быть модифицирован с применением первой модификации, следующий смежный нуклеотид может быть модифицирован с применением второй модификации, а следующий смежный нуклеотид модифицирован с применением первой модификации и так далее, при этом первая и вторая модификации отличаются.

Один или более из нуклеотидов в нечетных положениях первой цепи нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению могут быть модифицированы, причем первая цепь пронумерована от 5' к 3', самый 5'-крайний нуклеотид представляет собой нуклеотид номер 1 первой цепи. Термин "нечетный", описанный в настоящей заявке, означает число, неделимое на два. Примерами нечетных чисел являются 1, 3, 5, 7, 9, 11 и так далее. Один или более из нуклеотидов в четных положениях первой цепи нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению могут быть модифицированы, причем первая цепь пронумерована от 5' к 3'. Термин "четный", описанный в настоящей заявке, означает число, которое поровну делится на два. Примерами четных чисел являются 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 и так далее. Один или более из нуклеотидов в нечетных положениях второй цепи нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению могут быть модифицированы, при этом вторая цепь пронумерована от 3' к 5', причем наиболее 3'-концевой нуклеотид представляет собой нуклеотид номер 1 второй цепи. Один или более из нуклеотидов в четных положениях второй цепи нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению могут быть модифицированы, причем вторая цепь пронумерована от 3' к 5'.

Один или более нуклеотидов на первой и/или второй цепях могут быть модифицированы с образованием модифицированных нуклеотидов. Один или более из нуклеотидов в нечетных положениях первой цепи могут быть модифицированы. Один или более из нуклеотидов в четных положениях первой цепи могут быть модифицированы с применением по меньшей мере второй модификации, причем по меньшей мере вторая модификация отличается от модификации одного или более нуклеотидов в нечетных положениях. По меньшей мере один из одного или более модифицированных нуклеотидов в четных положениях может быть смежным с по меньшей мере одним или более модифицированными нуклеотидами в нечетных положениях.

Множество нуклеотидов в нечетных положениях первой цепи могут быть модифицированы в нуклеиновой кислоте согласно настоящему изобретению. Множество нуклеотидов в четных положениях первой цепи могут быть модифицированы с применением второй модификации. Первая цепь может содержать смежные нуклеотиды, которые модифицированы с применением общей модификации. Первая цепь также может содержать смежные нуклеотиды, которые модифицированы с применением второй отличающейся модификации.

Один или более из нуклеотидов в нечетных положениях второй цепи могут быть модифицированы с применением модификации, которая отличается от модификации нуклеотидов в нечетных положениях первой цепи, и/или один или более из нуклеотидов в четных положениях второй цепи могут быть модифицированы с применением модификации, аналогичной таковой для нуклеотидов в нечетных положениях первой цепи. По меньшей мере один из одного или более модифицированных нуклеотидов в четных положениях второй цепи может быть смежным с одним или более модифицированными нечетными нуклеотидами. Множество нуклеотидов в нечетных положениях второй цепи могут быть модифицированы с применением общей модификации, и/или множество нуклеотидов в четных положениях могут быть модифицированы с применением модификации, которая аналогична присутствующей на нечетных нуклеотидах первой цепи. Множество нуклеотидов в нечетных положениях второй цепи могут быть модифицированы с применением второй модификации, причем вторая модификация отличается от модификации

нуклеотидов в нечётных положениях первой цепи.

Вторая цепь может содержать смежные нуклеотиды, которые модифицированы с применением общей модификации, которая может представлять собой вторую модификацию, которая отличается от модификации нуклеотидов в нечётных положениях первой цепи.

В нуклеиновой кислоте согласно настоящему изобретению каждый из нуклеотидов в нечётных положениях в первой цепи и каждый из нуклеотидов в чётных положениях второй цепи может быть модифицирован с применением общей модификации, и каждый из нуклеотидов в чётных положениях первой цепи может быть модифицирован с применением второй модификации, и каждый из нуклеотидов в нечётных положениях во второй цепи может быть модифицирован с применением второй отличающейся модификации.

Модифицированные нуклеотиды первой цепи нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению могут быть сдвинуты по меньшей мере на один нуклеотид относительно немодифицированных или по-другому модифицированных нуклеотидов второй цепи.

Один или более или каждый из нуклеотидов в нечётных положениях могут быть модифицированы в первой цепи, и один или более или каждый из нуклеотидов в чётных положениях в чётных положениях могут быть модифицированы во второй цепи. Один или более или каждый из чередующихся нуклеотидов на любой или обеих цепях могут быть модифицированы с применением второй модификации. Один или более или каждый из нуклеотидов в чётных положениях могут быть модифицированы в первой цепи, и один или более или каждый из нуклеотидов в чётных положениях могут быть модифицированы во второй цепи. Один или более или каждый из чередующихся нуклеотидов на любой или обеих цепях могут быть модифицированы с применением второй модификации. Один или более или каждый из нуклеотидов в нечётных положениях в первой цепи могут быть модифицированы, и один или более из нуклеотидов в нечётных положениях во второй цепи могут быть модифицированы с применением общей модификации. Один или более или каждый из чередующихся нуклеотидов на любой или обеих цепях могут быть модифицированы с применением второй модификации. Один или более или каждый из нуклеотидов в чётных положениях в первой цепи могут быть модифицированы, и один или более или каждый из нуклеотидов в нечётных положениях во второй цепи могут быть модифицированы с применением общей модификации. Один или более или каждый из чередующихся нуклеотидов на любой или обеих цепях могут быть модифицированы с применением второй модификации.

Нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению может содержать одноцепочечные или двухцепочечные конструкции, которые содержат по меньшей мере две области чередующихся модификаций в одной или обеих цепях. Эти чередующиеся области могут содержать до приблизительно 12 нуклеотидов, но предпочтительно содержат от приблизительно 3 до приблизительно 10 нуклеотидов. Области чередующихся нуклеотидов могут быть расположены на концах одной или обеих цепей нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. Нуклеиновая кислота может содержать от 4 до приблизительно 10 чередующихся нуклеотидов на каждом конце (3' и 5'), и эти области могут быть отделены с помощью от приблизительно 5 до приблизительно 12 смежных немодифицированных или по-разному модифицированных или модифицированных с применением общей модификации нуклеотидов.

Нечётные нуклеотиды первой цепи могут быть модифицированы и чётные нуклеотиды могут быть модифицированы с применением второй модификации. Вторая цепь может содержать смежные нуклеотиды, которые модифицированы с применением общей модификации, которая может быть аналогична модификации нуклеотидов в нечётных положениях первой цепи. Один или более нуклеотидов второй цепи также могут быть модифицированы с применением второй модификации. Один или более нуклеотидов со второй модификацией могут быть смежными друг с другом и с нуклеотидами, имеющими модификацию, которая аналогична модификации нуклеотидов в нечётных положениях первой цепи. Первая цепь также может содержать фосфотиоатные связи между двумя нуклеотидами на 3'-конце и на 5'-конце. Вторая цепь может содержать фосфотиоатную связь между двумя нуклеотидами на 5'-конце. Вторая цепь также может быть конъюгирована с лигандом на 5'-конце.

Нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению может содержать первую цепь, содержащую смежные нуклеотиды, которые модифицированы с применением общей модификации. Один или более таких нуклеотидов могут быть смежными с одним или более нуклеотидами, которые могут быть модифицированы с применением второй модификации. Один или более нуклеотидов со второй модификацией могут быть смежными. Вторая цепь может содержать смежные нуклеотиды, которые модифицированы с применением общей модификации, которая может быть аналогична одной из модификаций одного или более нуклеотидов первой цепи. Один или более нуклеотидов второй цепи также могут быть модифицированы с применением второй модификации. Один или более нуклеотидов со второй модификацией могут быть смежными. Первая цепь также может содержать фосфотиоатные связи между двумя нуклеотидами на 5'-конце и на 3'-конце. Вторая цепь может содержать фосфотиоатную связь между двумя нуклеотидами на 3'-конце. Вторая цепь также может быть конъюгирована с лигандом на 5'-конце.

Нуклеотиды, пронумерованные от 5' к 3' на первой цепи и от 3' к 5' на второй цепи 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 и 25, могут быть модифицированы с применением модификации на первой цепи. Нуклеотиды, пронумерованные 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 и 24, могут быть модифицированы с

применением второй модификации на первой цепи. Нуклеотиды, пронумерованные 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, могут быть модифицированы с применением модификации на второй цепи. Нуклеотиды, пронумерованные 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 и 24, могут быть модифицированы с применением второй модификации на второй цепи. В отношении нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению нуклеотиды пронумерованы от 5' к 3' на первой цепи и от 3' к 5' на второй цепи.

Нуклеотиды, пронумерованные 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 и 24, могут быть модифицированы с применением модификации на первой цепи. Нуклеотиды, пронумерованные 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, могут быть модифицированы с применением второй модификации на первой цепи. Нуклеотиды, пронумерованные 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, могут быть модифицированы с применением модификации на второй цепи. Нуклеотиды, пронумерованные 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 и 24, могут быть модифицированы с применением второй модификации на второй цепи.

Понятно, что если первая и/или вторая цепи короче чем 25 нуклеотидов в длину, например, 19 нуклеотидов в длину, то нуклеотиды с номерами 20, 21, 22, 23, 24 и 25, подлежащие модификации, отсутствуют. Специалист поймет приведенное выше описание для применения к более коротким цепям, соответственно.

Один или более модифицированных нуклеотидов на первой цепи могут быть спарены с модифицированными нуклеотидами на второй цепи, имеющими общую модификацию. Один или более модифицированных нуклеотидов на первой цепи могут быть спарены с модифицированными нуклеотидами на второй цепи, имеющими другую модификацию. Один или более модифицированных нуклеотидов на первой цепи могут быть спарены с немодифицированными нуклеотидами на второй цепи. Один или более модифицированных нуклеотидов на второй цепи могут быть спарены с немодифицированными нуклеотидами на первой цепи. Другими словами, чередующиеся нуклеотиды могут быть выравнены на двух цепях таким образом, что, например, все модификации в чередующихся областях второй цепи спарены с идентичными модификациями в первой цепи или, согласно другому варианту, модификации могут быть компенсированы одним нуклеотидом с общими модификациями в чередующихся областях одной цепи, спаренным с отличающимися модификациями (т.е. второй или дополнительной модификацией) в другой цепи. Другой вариант заключается в наличии разных модификаций в каждой из цепей.

Модификации на первой цепи могут быть сдвинуты на один нуклеотид относительно модифицированных нуклеотидов на второй цепи так, что нуклеотиды с общей модификацией не спариваются друг с другом.

Модификация и/или модификации могут быть по отдельности и независимо выбраны из группы, состоящей из 3'-концевого дезокситимина, 2'-О-метила, 2'-дезокси-модификации, 2'-амино-модификации, 2'-алкил-модификации, морфолино-модификации, модификации фосфоамидатом, модификации 5'-фосфотиоатной группой, модификации 5'-фосфатом или миметиком 5'-фосфата, а также модификации производным холестерина или группой бисдециламида додекановой кислоты, и/или модифицированный нуклеотид может представлять собой любой из закрытого нуклеотида, лишённого азотистого основания нуклеотида или содержащего неприродное основание нуклеотида.

По меньшей мере одна модификация может представлять собой 2'-О-метил и/или по меньшей мере одна модификация может представлять собой 2'-F. Дополнительные модификации, описанные в настоящей заявке, могут присутствовать на первой и/или второй цепях.

В описании настоящего изобретения "аналогичная или общая модификация" означает одну и ту же модификацию для любого нуклеотида, будь то А, G, C или U, модифицированного с применением группы, такой как металльная группа или фторгруппа. Это не подразумевает аналогичное добавление на одном и том же нуклеотиде. Например, 2'-F-dU, 2'-F-dA, 2'-F-dC, 2'-F-dG все считаются аналогичными или общими модификациями, так же как и 2'-OMe-rU, 2'-OMe-rA; 2'-OMe-rC; 2'-OMe-rG. Модификация 2'-F представляет собой модификацию, отличную от модификации 2'-OMe.

Некоторые типичные модифицированные последовательности нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению показаны в примерах. Предполагается, что эти примеры являются типичными, а не ограничивающими.

Предпочтительно нуклеиновая кислота может содержать модификацию и вторую или дополнительную модификацию, которые по отдельности и независимо выбраны из группы, включающей 2'-О-метил-модификацию и 2'-F-модификацию. Нуклеиновая кислота может содержать модификацию, которая представляет собой 2'-О-метил (2'-OMe), который может представлять собой первую модификацию, и вторую модификацию, которая представляет собой 2'-F. Нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению также может содержать фосфотиоатную модификацию и/или дезокси-модификацию, которая может присутствовать на или между 2 или 3 концевыми нуклеотидами каждого или любого конца каждой или обеих цепей.

Согласно настоящему изобретению предложена, в качестве дополнительного аспекта, нуклеиновая кислота для ингибирования экспрессии LPA в клетке, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 или 43, в которой нуклеотиды первой цепи модифицированы с применением первой модификации на нечетных нуклеотидах и модифицированы с применением второй модификации на четных нуклеотидах, и нуклеотиды второй



цепи модифицированы с применением третьей модификации на четных нуклеотидах и модифицированы с применением четвертой модификации на нечетных нуклеотидах, причем по меньшей мере первая модификация отличается от второй модификации, а третья модификация отличается от четвертой модификации. Третья и первая модификации могут быть одинаковыми или различными, вторая и четвертая модификации могут быть одинаковыми или различными. Первая и вторая модификации могут отличаться друг от друга, и третья и четвертая модификации могут отличаться друг от друга.

Вторая цепь может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 или 44. Нуклеотиды первой цепи могут быть модифицированы с применением первой модификации на нечетных нуклеотидах и модифицированы с применением второй модификации на четных нуклеотидах, и вторая цепь может быть модифицирована на нечетных нуклеотидах с применением второй модификации и модифицирована с применением первой модификации на четных нуклеотидах. Первая модификация может представлять собой 2'OMe, и вторая модификация может представлять собой 2' F. Первая цепь может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 9, и/или вторая цепь может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10. Модификации могут представлять собой те, которые представлены в табл. 1.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой нуклеотиды в положениях 2 и 14 с 5'-конца первой цепи не модифицированы с применением 2'-О-метильной модификации, а нуклеотид на второй цепи, который соответствует положению 13 первой цепи, не модифицирован с применением 2'-О-метильной модификации.

Нуклеотид на второй цепи, который "соответствует" положению на первой цепи, приемлемо, является нуклеотидом, который спаривается с указанным нуклеотидом на первой цепи.

Согласно одному аспекту нуклеотид на второй цепи, который соответствует положению 13 первой цепи, представляет собой нуклеотид, который образует пару оснований с положением 13 первой цепи.

Согласно одному аспекту нуклеотид на второй цепи, который соответствует положению 11 первой цепи, представляет собой нуклеотид, который образует пару оснований с положением 11 первой цепи.

Согласно одному аспекту нуклеотид на второй цепи, который соответствует положению 12 первой цепи, представляет собой нуклеотид, который образует пару оснований с положением 12 первой цепи.

Эту номенклатуру можно применять к другим положениям второй цепи. Например, в 19-членной нуклеиновой кислоте, которая является двухцепочечной и имеет тупые концы, положение 13 первой цепи будет спариваться с положением 7 второй цепи. Положение 11 первой цепи будет спариваться с положением 9 второй цепи. Эту номенклатуру можно применять к другим положениям второй цепи.

Нуклеотид, который соответствует положению 13 первой цепи, приемлемо представляет собой положение 13 второй цепи, при отсчете от 3'-второй цепи, начиная с первого нуклеотида двухцепочечной области. Аналогичным образом, положение 11 второй цепи приемлемо представляет собой 11-й нуклеотид с 3'-второй цепи, начиная с первого нуклеотида двухцепочечной области. Эту номенклатуру можно применять к другим положениям второй цепи.

Согласно одному аспекту, в случае частичной комплементарности первой и второй цепей, нуклеотид на второй цепи, который "соответствует" положению на первой цепи, необязательно может образовывать пару оснований, если это положение представляет собой положение, в котором присутствует несоответствие, однако принцип номенклатуры все еще применим.

Предпочтительной является первая и вторая цепи, которые полностью комплементарны на протяжении дуплексной области (не учитывая любые выступающие области), и в двухцепочечной области нуклеиновой кислоты отсутствуют несоответствия.

Также предпочтительными являются:

нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой нуклеотиды в положениях 2 и 14 с 5'-конца первой цепи не модифицированы с применением 2'-О-метильной модификации, а нуклеотид на второй цепи, который соответствует положению 11 первой цепи, не модифицирован с применением 2'-О-метильной модификации;

нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой нуклеотиды в положениях 2 и 14 с 5'-конца первой цепи не модифицированы с применением 2'-О-метильной модификации, а нуклеотиды на второй цепи, которые соответствуют положениям 11 и 13 первой цепи, не модифицированы с применением 2'-О-метильной модификации.

Согласно одному аспекту нуклеотид на второй цепи, который соответствует положению 12 первой цепи, не модифицирован с применением 2'-О-метильной модификации. Это ограничение на нуклеиновой кислоте может наблюдаться с любым другим ограничением, описанным в настоящей заявке.

Таким образом, другим аспектом настоящего изобретения является нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой нуклеотиды в положениях 2 и 14 с 5'-конца первой цепи не модифицированы с применением 2'-О-метильной модификации, а нуклеотиды на второй цепи, которые соответствуют положению 11-13 первой цепи, не модифицированы с применением 2'-О-метильной модификации.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой нуклеотиды в положениях 2 и 14 с 5'-конца первой цепи не модифицированы с применением 2'-О-метильной модификации, а нуклеотиды

на второй цепи, которые соответствуют положению 11 или 13, или 11 и 13, или 11-13 первой цепи, модифицированы с применением 2'-фтор модификации.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой нуклеотиды в положениях 2 и 14 с 5'-конца первой цепи модифицированы с применением 2'-фтор-модификации, а нуклеотиды на второй цепи, которые соответствуют положениям 11 или 13, или 11 и 13, или 11-13 первой цепи, не модифицированы с применением 2'-О-метильной модификации.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой нуклеотиды в положениях 2 и 14 с 5'-конца первой цепи модифицированы с применением 2'-фтор модификации, а нуклеотиды на второй цепи, которые соответствуют положению 11, или 13, или 11 и 13 или предпочтительно 11-13 первой цепи модифицированы с применением 2'-фтор модификации. Предпочтительно в данном варианте реализации все четные нуклеотиды первой цепи модифицированы 2'-фтор модификацией, а все нечетные нуклеотиды первой цепи модифицированы 2'-О-метильной модификацией. Кроме того, нуклеотиды на второй цепи, отличные от тех, которые соответствуют положению 11, или 13, или 11 и 13, или предпочтительно 11-13 первой цепи, модифицированы 2'-О-метильной модификацией. Одним из преимуществ такой нуклеиновой кислоты является то, что она содержит относительно небольшое количество не встречающихся в природе модифицированных нуклеотидов, но, тем не менее, способна эффективно ингибировать целевой ген в течение длительных периодов времени. Такую нуклеиновую кислоту легче синтезировать, чем соответствующие нуклеиновые кислоты с большим количеством не встречающихся в природе (2'-Ф-модифицированных) нуклеотидов.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой более 50% нуклеотидов первой и/или второй цепей содержат 2'-О-метильную модификацию, например, более 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% или 85% или более первой и/или второй цепей содержат 2'-О-метильную модификацию, предпочтительно как измерено в процентах от общего количества нуклеотидов в обеих первой и второй цепях.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой более 50% нуклеотидов первой и/или второй цепей содержат природную модификацию РНК, например, в которой более 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% или 85% или более первой и/или второй цепей содержат такую модификацию, предпочтительно как измерено в процентах от общего количества нуклеотидов обеих первой и второй цепей. Подходящие природные модификации включают, наряду с 2'-О'-метилом, другие 2'-модификации сахара, в частности, 2'-Н-модификацию, приводящую к получению ДНК-нуклеотида.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, содержащая не более 20%, например, не более 15%, например, не более 10%, нуклеотидов, которые имеют 2'-модификации, которые не являются 2'-О-метильными модификациями, на первой и/или второй цепях, предпочтительно как измерено в процентах от общего количества нуклеотидов обеих первой и второй цепей.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, содержащая не более 20% (например, не более 15% или не более 10%) 2'-фтор-модификаций на первой и/или второй цепях, предпочтительно как измерено в процентах от общего количества нуклеотидов обеих цепей.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой все нуклеотиды модифицированы с применением 2'-О-метильной модификации, за исключением положений 2 и 14 с 5'-конца первой цепи и нуклеотидов на второй цепи, которые соответствуют положению 11 или 13, или 11 и 13, или предпочтительно 11-13 первой цепи. Предпочтительно нуклеотиды, которые не модифицированы с применением 2'-О-метила, модифицированы с применением фтора в положении 2'.

Предпочтительной является нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой все нуклеотиды нуклеиновой кислоты модифицированы в 2'-положении сахара. Предпочтительно эти нуклеотиды модифицированы с применением 2'-фтор-модификации, причем указанная модификация не является 2'-О-метильной модификацией.

Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению могут содержать один или более нуклеотидов, модифицированных в 2'-положении с применением 2'-Н, и, следовательно, содержащие ДНК-нуклеотид внутри нуклеиновой кислоты. Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению могут содержать ДНК-нуклеотиды в положениях 2 и/или 14 первой цепи, при отсчете от 5'-конца первой цепи. Нуклеиновые кислоты могут содержать ДНК-нуклеотиды на второй цепи, которые соответствуют положению 11 или 13, или 11 и 13 или 11-13 первой цепи.

Согласно одному аспекту присутствует не более одной ДНК на нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению.

Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению могут содержать один или более LNA-нуклеотидов. Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению могут содержать LNA-нуклеотиды в положениях 2 и/или 14 первой цепи, при отсчете от 5'-конца первой цепи. Нуклеиновые кислоты могут содержать LNA на второй цепи, которые соответствуют положению 11 или 13, или 11 и 13 или 11-13 первой цепи.

В одном аспекте нуклеиновая кислота модифицирована на первой цепи, предпочтительно на протяжении всей цепи, с чередованием 2'-О-метил модификаций и 2'-фтор модификаций, а положения 2 и 14 (начиная с 5'-конца) модифицированы с применением 2'-фтора. Предпочтительно вторая цепь модифицирована 2'-фтор-модификациями нуклеотидов на второй цепи, которые соответствуют положению 11 или 13, или 11 и 13, или

предпочтительно 11-13 первой цепи. Предпочтительно вторая цепь модифицирована 2'-фтор модификациями в положениях 11-13, считая от 3'-конца, начиная с первого положения комплементарной (двухцепочечной) области, а остальные модификации представляют собой природные модификации, предпочтительно 2'-О-метил. По крайней мере в этом случае нуклеиновая кислота предпочтительно имеет тупой конец, по меньшей мере, на конце, который представляет собой 5'-конец первой цепи.

Нуклеотид второй цепи, который находится в положении, соответствующем, например, четному нуклеотиду первой цепи, представляет собой нуклеотид второй цепи, спаренный с четным нуклеотидом первой цепи.

В одном аспекте нуклеиновой кислоты нуклеотид/нуклеотиды второй цепи в положении, соответствующем нуклеотиду 11 или нуклеотиду 13, или нуклеотидам 11 и 13, или предпочтительно нуклеотидам 11-13 первой цепи, модифицирован/модифицированы с применением четвертой модификации. Предпочтительно, чтобы все нуклеотиды второй цепи, кроме нуклеотида/нуклеотидов в положении, соответствующем нуклеотиду 11 или нуклеотиду 13, или нуклеотидам 11 и 13, или предпочтительно нуклеотидам 11-13 первой цепи, был модифицирован/были модифицированы с применением третьей модификации. Предпочтительно нуклеотиды 2 и 14 одной и той же нуклеиновой кислоты или предпочтительно все четные нуклеотиды первой цепи модифицированы с применением первой модификации. В дополнение или альтернативно, нечетные нуклеотиды первой цепи модифицированы с применением второй модификации. Четвертая модификация предпочтительно отличается от второй модификации и предпочтительно отличается от третьей модификации, и четвертая модификация предпочтительно является такой же, как первая модификация. Первая и четвертая модификации предпочтительно представляют собой 2'-О-Ме модификации, и вторая и третья модификации предпочтительно представляют собой 2'-F модификации. Нуклеотиды на первой цепи пронумерованы последовательно, начиная с нуклеотида номер 1 на 5'-конце первой цепи.

В одном аспекте нуклеиновой кислоты все четные нуклеотиды первой цепи модифицированы с применением первой модификации, все нечетные нуклеотиды первой цепи модифицированы с применением второй модификации, все нуклеотиды второй цепи в положениях, соответствующих нуклеотидам 11-13 первой цепи, модифицированы с применением четвертой модификации, все нуклеотиды второй цепи, отличающиеся от нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 11-13 первой цепи, модифицированы с применением третьей модификации, где первая и четвертая модификации представляют собой 2'-F, а вторая и третья модификации представляют собой 2'-О-Ме. Нуклеотиды на первой цепи пронумерованы последовательно, начиная с нуклеотида номер 1 на 5'-конце первой цепи.

В одном аспекте нуклеиновой кислоты каждый из нуклеотидов первой цепи и второй цепи является модифицированным нуклеотидом.

Один аспект представляет собой двухцепочечную нуклеиновую кислоту для ингибирования экспрессии LPA, предпочтительно в клетке, причем нуклеиновая кислота содержит первую цепь и вторую цепь, причем последовательность первой цепи включает последовательность из по меньшей мере 15 нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида из любой из последовательностей SEQ ID NO: 9, 5, 1, 3, 7, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 или 43, предпочтительно SEQ ID NO: 9, где все четные нуклеотиды первой цепи модифицированы первой модификацией, все нечетные нуклеотиды первой цепи модифицированы второй модификацией, все нуклеотиды второй цепи в положениях, соответствующих нуклеотидам 11-13 первой цепи, модифицированы четвертой модификацией, все нуклеотиды второй цепи, отличающиеся от нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 11-13 первой цепи, модифицированы третьей модификацией, причем первая и четвертая модификации представляют собой 2'-F и вторая и третья модификации представляют собой 2'-О-Ме.

Согласно одному аспекту нуклеиновые кислоты, которые представляют собой молекулы миРНК, в которых нуклеотиды в положениях 2 и 14 от 5'-конца первой цепи не модифицированы с применением 2'-О-метил модификации, и нуклеиновая кислота включает одно или более, или все из следующих:

- (i) инвертированный нуклеотид, предпочтительно 3'-3'-связь на 3'-конце второй цепи;
- (ii) одну или более фосфодитионатных связей;
- (iii) нуклеотид второй цепи, соответствующий положению 11 или 13 первой цепи, не модифицированный с применением 2'-О-метильной модификации, при этом предпочтительно одно или оба из этих положений содержат 2'-фтор-модификацию;
- (iv) нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере 80% от всех нуклеотидов, содержащих 2'-О-метильную модификацию;
- (v) нуклеиновая кислота содержит не более 20% нуклеотидов, которые содержат 2'-фтор-модификации.

Согласно настоящему изобретению также предложена нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой нуклеотиды в положениях 2 и 14 с 5'-конца первой цепи и нуклеотиды в положениях 7 и/или 9 или 7-9 с 5'-конца второй цепи модифицированы с применением 2'-фтор-модификации, и по меньшей мере 90% оставшихся нуклеотидов являются 2'-О-метил-модифицированными или содержат другую природную 2'-модификацию.

Конкретными предпочтительными примерами для 19-членной двухцепочечной нуклеиновой кисло-

ты с тупыми концами и без липких концов, являются:

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой нуклеотиды в положениях 2 и 14 с 5'-конца первой цепи не модифицированы с применением 2'-О-метильной модификации, и нуклеотид в положении 7 с 5'-конца второй цепи не модифицирован с применением 2'-О-метильной модификации.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой нуклеотиды в положениях 2 и 14 с 5'-конца первой цепи не модифицированы с применением 2'-О-метильной модификации, и нуклеотид в положении 9 с 5'-конца второй цепи не модифицирован с применением 2'-О-метильной модификации.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой нуклеотиды в положениях 2 и 14 с 5'-конца первой цепи не модифицированы с применением 2'-О-метильной модификации, и нуклеотиды в положениях 7 и 9 с 5'-конца второй цепи не модифицированы с применением 2'-О-метильной модификации.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой нуклеотиды в положениях 2 и 14 с 5'-конца первой цепи не модифицированы с применением 2'-О-метильной модификации, и нуклеотиды в положениях 7-9 с 5'-конца второй цепи не модифицированы с применением 2'-О-метильной модификации.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой нуклеотиды в положениях 2 и 14 с 5'-конца первой цепи не модифицированы с применением 2'-О-метильной модификации, и нуклеотиды в положениях 7 и/или 9, или 7-9 с 5'-конца второй цепи модифицированы с применением 2'-фтор-модификации.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой нуклеотиды в положениях 2 и 14 с 5'-конца первой цепи модифицированы с применением 2'-фтор-модификации, и нуклеотиды в положениях 7 и/или 9, или 7-9 с 5'-конца второй цепи не модифицированы с применением 2'-О-метильной модификации.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой нуклеотиды в положениях 2 и 14 с 5'-конца первой цепи модифицированы с применением 2'-фтор-модификации, и нуклеотиды в положениях 7 и/или 9, или 7-9 с 5'-конца второй цепи модифицированы с применением 2'-фтор-модификации.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой более 50% нуклеотидов первой и/или второй цепей содержат 2'-О-метильную модификацию, например, более 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% или 85% или более первой и/или второй цепей содержат 2'-О-метильную модификацию, предпочтительно как измерено в процентах от общего количества нуклеотидов обеих первой и второй цепей.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой более 50% нуклеотидов первой и/или второй цепей содержат природную модификацию РНК, например, более 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% или 85% или более первой и/или второй цепей содержат такую модификацию, предпочтительно как измерено в процентах от общего количества нуклеотидов обеих первой и второй цепей. Подходящие природные модификации включают, наряду с 2'-О'-метилом, другие 2'-модификации сахара, в частности, 2'-Н-модификацию, приводящую к получению ДНК-нуклеотида.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, содержащая не более 20%, например, не более 15%, например, более 10%, нуклеотидов, которые содержат 2'-модификации, которые не являются 2'-О-метильными модификациями, на первой и/или второй цепях, предпочтительно как измерено в процентах от общего количества нуклеотидов обеих первой и второй цепей.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, содержащая не более 20% (например, не более 15% или не более 10%) 2'-фтор-модификаций на первой и/или второй цепях, предпочтительно как измерено в процентах от общего количества нуклеотидов обеих цепей.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой все нуклеотиды модифицированы с применением 2'-О-метильной модификации, за исключением положений 2 и 14 с 5'-конца первой цепи и нуклеотидов в положениях 7 и/или 9 с 5'-конца второй цепи. Предпочтительно нуклеотиды, которые не модифицированы с применением 2'-О-метила, модифицированы с применением фтора в положении 2'.

Нуклеиновая кислота, раскрытая в настоящей заявке, в которой все нуклеотиды модифицированы с применением 2'-О-метильной модификации, за исключением положений 2 и 14 с 5'-конца первой цепи и нуклеотидов в положениях 7-9 с 5'-конца второй цепи. Предпочтительно нуклеотиды, которые не модифицированы с применением 2'-О-метила, модифицированы с применением фтора в положении 2'.

Для нуклеиновой кислоты, содержащей дуплексную область из 20 пар оснований, вторая цепь предпочтительно не содержит 2'-О-метильную группу в нуклеотидах 8, 9 или 10, при отсчете от 5'-конца дуплекса, соответствующих положениям 13, 12 и 11 первой цепи, соответственно.

Для нуклеиновой кислоты, содержащей дуплексную область из 21 пары оснований, вторая цепь предпочтительно не содержит 2'-О-метильную группу в нуклеотидах 9 или 10, или 11, при отсчете от 5'-конца дуплекса, соответствующих положениям 13, 12 и 11 первой цепи, соответственно.

Нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению может включать одну или более фосфотиоатных модификаций на одном или более концах первой и/или второй цепи. Необязательно, каждый или любой конец первой цепи может содержать один, два или три нуклеотида, модифицированных фосфотиоатом. Необязательно, каждый или любой конец второй цепи может содержать один, два или три нуклеотида, модифицированных фосфотиоатом.

В одном варианте реализации первая цепь может включать по меньшей мере одну фосфотиоатную

(ps) связь.

В одном варианте реализации первая цепь может дополнительно содержать фосфотиоатную связь между двумя 3'-концевыми нуклеотидами или фосфотиоатные связи между тремя 3'-концевыми нуклеотидами.

В одном варианте реализации связи между другими нуклеотидами в первой цепи представляют собой фосфодиэфирные связи.

В одном варианте реализации первая цепь может включать более 1 фосфотиоатной связи.

В другом варианте реализации вторая цепь может содержать фосфотиоатную связь между двумя 3'-концевыми нуклеотидами или фосфотиоатную связь между тремя 3'-концевыми нуклеотидами.

В другом дополнительном варианте реализации вторая цепь может содержать фосфотиоатную связь между двумя 5'-концевыми нуклеотидами или фосфотиоатную связь между тремя 5'-концевыми нуклеотидами.

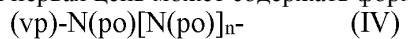
В одном аспекте нуклеиновая кислота содержит одну или более фосфодитиоатных связей, таких как 1, 2, 3 или 4 фосфодитиоатных связи. Предпочтительно имеется до 4 фосфодитиоатных связей, по одной на 5' и 3' концах первой и второй цепей.

Применение фосфодитиоатной связи в нуклеиновой кислоте согласно изобретению снижает изменение стереохимии популяции молекул нуклеиновой кислоты по сравнению с молекулами, содержащими фосфотиоат в том же положении. Фосфотиоатная связь действительно вводит хиральный центр, и трудно контролировать, какой несвязывающий кислород замещает серу. Применение фосфодитиоата гарантирует отсутствие хирального центра в этой связи и, таким образом, уменьшает или устраняет любые вариации в популяции молекул нуклеиновых кислот в зависимости от количества фосфодитиоатных и фосфотиоатных связей, применяемых в молекуле нуклеиновой кислоты.

В одном аспекте нуклеиновая кислота содержит фосфотиоатную связь между каждым из трех 3'-концевых нуклеотидов и/или между каждым из трех 5'-концевых нуклеотидов на первой цепи и/или между каждым из трех 3'-концевых нуклеотидов и/или между каждым из трех 5'-концевых нуклеотидов второй цепи, когда на этом конце отсутствует фосфодитиоатная связь. Отсутствие фосфодитиоатной связи на конце означает, что связь между двумя концевыми нуклеотидами или предпочтительно между тремя концевыми нуклеотидами рассматриваемого конца нуклеиновой кислоты является связями, отличными от фосфодитиоатных связей.

Согласно настоящему изобретению также предложена нуклеиновая кислота в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения, описанным в настоящей заявке, в которой первая цепь РНК имеет концевой 5'-(Е)-винилфосфонатный нуклеотид, и концевой 5'-(Е)-винилфосфонатный нуклеотид соединен со вторым нуклеотидом в первой цепи с помощью фосфодиэфирной связи. Первая цепь может включать более одной фосфодиэфирной связи. В одном варианте реализации первая цепь может содержать фосфодиэфирные связи по меньшей мере между тремя 5'-концевыми нуклеотидами. В одном варианте реализации первая цепь может содержать фосфодиэфирные связи между по меньшей мере четырьмя 5'-концевыми нуклеотидами.

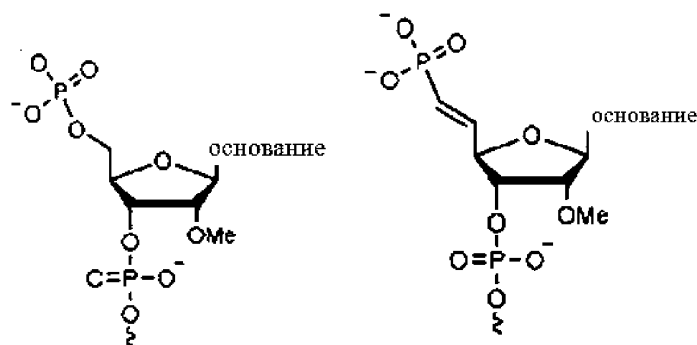
В одном варианте реализации первая цепь может содержать формулу (IV):



в которой "(vp)-" представляет собой 5'(Е)-винилфосфонат, "N" представляет собой нуклеотид, "po" представляет собой фосфодиэфирную связь, и n составляет от 1 до (общее количество нуклеотидов в первой цепи -2), при этом предпочтительно n составляет от 1 до (общее количество нуклеотидов в первой цепи -3), при этом более предпочтительно n составляет от 1 до (общее количество нуклеотидов в первой цепи -4).

В одном аспекте, если самый первый 5' -нуклеотид первой цепи представляет собой нуклеотид, отличный от А или U, этот нуклеотид заменен на А или U в последовательности. Предпочтительно, если самый первый 5'-нуклеотид первой цепи представляет собой нуклеотид, отличный от U, этот нуклеотид заменен на U, а более предпочтительно на U с 5'-винилфосфонатом в последовательности.

Концевой 5'-(Е)-винилфосфонатный нуклеотид представляет собой нуклеотид, в котором природная фосфатная группа на 5'-конце замещена Е-винилфосфонатом, в котором мостиковый 5'-атом кислорода концевого нуклеотида 5'-фосфорилированной цепи замещен метинильной (-CH=) группой:



Нуклеотиды с природным фосфатом

на 5'-конце

Нуклеотид с E-винилфосфонатом

на 5'-конце

5'-(E)-Винилфосфонат представляет собой имитатор 5'-фосфата. Биологический имитатор представляет собой молекулу, которая способна выполнять ту же функцию, как и исходная молекула, которую она имитирует, и структурно очень сходна с ней.

Применительно к настоящему изобретению 5'(E)-винилфосфонат имитирует функцию нормального 5'-фосфата, например, обеспечивая эффективную загрузку RISC. Кроме того, благодаря своей незначительно измененной структуре 5'(E)-винилфосфонат способен стабилизировать 5'-концевой нуклеотид, защищая его от дефосфорилирования ферментами, такими как фосфатазы.

В одном варианте реализации концевой 5'(E)-винилфосфонатный нуклеотид представляет собой нуклеотид РНК.

В одном аспекте нуклеиновая кислота:

- (i) имеет фосфотиоатную связь между тремя 3'-концевыми нуклеотидами и тремя 5'-концевыми нуклеотидами первой цепи;
- (ii) конъюгирована с трехантенным лигандом либо на 3'-конце нуклеотида, либо на 5'-конце нуклеотида второй цепи;
- (iii) имеет фосфотиоатную связь между тремя концевыми нуклеотидами второй цепи на конце, противоположном тому, который конъюгирован с трехантенным лигандом; и
- (iv) все оставшиеся связи между нуклеотидами первой и/или второй цепи являются фосфодиэфирными связями.

В одном аспекте нуклеиновая кислота:

- (i) имеет концевой 5'(E)-винилфосфонатный нуклеотид на 5'-конце первой цепи;
- (ii) имеет фосфотиоатную связь между тремя 3'-концевыми нуклеотидами на первой и второй цепи и между тремя 5'-концевыми нуклеотидами на второй цепи; и
- (iii) все оставшиеся связи между нуклеотидами первой и/или второй цепи являются фосфодиэфирными связями.

В одном аспекте нуклеиновая кислота, которая предпочтительно представляет собой миРНК, которая ингибирует экспрессию LPA, предпочтительно через РНКи, включает один или более, или все из следующих:

- (i) модифицированный нуклеотид;
- (ii) модифицированный нуклеотид, отличающийся от 2'-ОМе модифицированного нуклеотида в положениях 2 и 14 с 5'-конца первой цепи, предпочтительно 2'-F модифицированный нуклеотид;
- (iii) каждый из нечетных нуклеотидов первой цепи, пронумерованный, начиная с одного на 5'-конце первой цепи, являются 2'-ОМе модифицированными нуклеотидами;
- (iv) каждый из четных нуклеотидов первой цепи, пронумерованный, начиная с первого на 5'-конце первой цепи, представляют собой 2'-F модифицированные нуклеотиды;
- (v) нуклеотид второй цепи, соответствующий положению 11 или 13 первой цепи, модифицирован с применением модификации, отличной от 2'-ОМе модификации, предпочтительно, когда одно или оба этих положения содержат 2'-F модификацию;
- (vi) инвертированный нуклеотид, предпочтительно 3'-3' связь на 3'-конце второй цепи;
- (vii) одна или более фосфотиоатных связей;
- (viii) одна или более фосфодитиоатных связей; и/или
- (ix) первая цепь имеет концевой 5'(E)-винилфосфонатный нуклеотид на своем 5'-конце, и в этом случае концевой 5'(E)-винилфосфонатный нуклеотид предпочтительно представляет собой уридин и предпочтительно связан со вторым нуклеотидом в первой цепи фосфодиэфирной связью.

Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению могут содержать один или более инвертированных нуклеотидов, например, инвертированный тимидин или инвертированный аденин (например, см. Takei, et al., 2002. JBC 277 (26):23800-06).

В одном аспекте нуклеиновая кислота согласно изобретению содержит один или более инвертиро-

ванных рибонуклеотидов, предпочтительно инвертированный аденин, с применением связи 5'-5' или связи 3'-3', предпочтительно связи 3'-3' на 3'-конце второй цепи.

Нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению может содержать инвертированный РНК-нуклеотид на одном или нескольких концах цепи. Такие инвертированные нуклеотиды обеспечивают стабильность нуклеиновой кислоты. Предпочтительно нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере инвертированный нуклеотид на одном или нескольких из 3'-конца по меньшей мере одной из цепей и/или на 5'-конце второй цепи. Более предпочтительно нуклеиновая кислота содержит инвертированный нуклеотид на 3'-конце второй цепи. Наиболее предпочтительно нуклеиновая кислота содержит инвертированный РНК-нуклеотид на 3'-конце второй цепи, и этот нуклеотид предпочтительно представляет собой инвертированный А. Инвертированный нуклеотид предпочтительно присутствует на конце цепи не в виде липкого конца, а напротив соответствующего нуклеотида в другой цепи. Нуклеиновая кислота с такой модификацией является стабильной и легко синтезируется.

Лиганды.

Нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению может быть конъюгирована с лигандом. Эффективная доставка олигонуклеотидов, в частности, двухцепочечных нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, в клетки в условиях *in vivo* является важной и требует специфичного нацеливания и существенной защиты от внеклеточной среды, в частности, от сывороточных белков. Одним из способов достижения специфичного нацеливания является конъюгирование лиганда с нуклеиновой кислотой. Лиганд помогает нацеливать нуклеиновую кислоту на требуемый сайт-мишень. Существует потребность в конъюгации соответствующих лигандов для целевых рецепторных молекул для того чтобы клетки-мишени поглощали конъюгированные молекулы с помощью таких механизмов как различные опосредуемые рецепторами пути эндоцитоза или функционально аналогичные процессы.

Одним из примеров является комплекс рецептора асиалогликопротеина (ASGP-R), состоящий из варьирующихся соотношений мультимеров мембранных рецепторов ASGR1 и ASGR2, который очень распространен на гепатоцитах и обладает высокой аффинностью в отношении группы GalNAc, описанной в настоящей заявке. В патенте США № 5885968 представлено одно из первых раскрытий применения трехантенных кластерных гликозидов в качестве конъюгированных лигандов. Конъюгаты, имеющие три лиганда GalNAc и содержащие фосфатные группы, известны и описаны в Dubber et al. (*Bioconjug. Chem.* 2003 Jan-Feb;14(1):239-46). Комплекс ASGP-R проявляет в 50 раз более высокую аффинность в отношении N-ацетил-D-галактозиламина (GalNAc) по сравнению с D-Gal.

Комплекс рецептора асиалогликопротеина (ASGP-R), который специфично распознает концевые  $\beta$ -галактозилные субъединицы гликозилированных белков или других олигосахаридов (Weigel, P.H. et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 2002 Sep 19; 1572(2-3):341-63), можно применять для доставки лекарственного средства в гепатоциты печени, экспрессирующие рецепторный комплекс, путем ковалентного связывания галактозы или галактозамина с лекарственным веществом (Ishibashi, S.; et al., *J Biol. Chem.* 1994 Nov 11;269(45):27803-6). Кроме того, аффинность связывания может быть значительно повышена с помощью поливалентного эффекта, который может быть достигнут путем повторения нацеливающей группы (Bissen E.A., et al., *J Med Chem.* 1995 Apr 28; 38(9):1538-46).

Комплекс ASGP-R выступает в качестве посредника для активного поглощения гликопротеинов, содержащих концевой  $\beta$ -галактозил, в эндосомы клетки. Таким образом, ASGPR очень подходит для нацеленной доставки лекарственных средств-кандидатов, конъюгированных с такими лигандами, например, нуклеиновых кислот, в экспрессирующие рецептор клетки (Akinc et al., *Mol Ther.* 2010 Jul; 18(7):1357-64).

В более общем случае лиганд может содержать сахарид, который выбран так, чтобы обладать аффинностью в отношении по меньшей мере одного типа рецептора на клетке-мишени. В частности, рецептор находится на поверхности клетки печени млекопитающего, например, печеночный комплекс рецептора асиалогликопротеина, описанный ранее (ASGP-R).

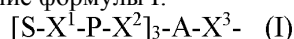
Сахарид может быть выбран из N-ацетилгалактозамина, маннозы, галактозы, глюкозы, глюкозамина и фукозы. Сахарид может представлять собой N-ацетилгалактозамин (GalNAc).

Таким образом, лиганд для применения в настоящем изобретении может содержать (i) одну или более групп N-ацетилгалактозамина (GalNAc) и его производных, и (ii) линкер, причем указанный линкер конъюгирует группы GalNAc с последовательностью, определенной в любых предыдущих аспектах. Линкер может иметь двухвалентную, трехвалентную или четырехвалентную разветвленную структуру. Нуклеотиды могут быть модифицированы, как определено в настоящей заявке.

"GalNAc" относится к 2-ацетиламино-2-дезоксид-галактопиранозе, обычно называемой в литературе N-ацетилгалактозамином. Ссылка на "GalNAc" или "N-ацетилгалактозамин" включает обе  $\beta$ -форму, 2-ацетиламино-2-дезоксид- $\beta$ -D-галактопиранозу, и  $\alpha$ -форму, 2-ацетиламино-2-дезоксид- $\alpha$ -D-галактопиранозу. Обе  $\beta$ -форма, 2-ацетиламино-2-дезоксид- $\beta$ -D-галактопираноза, и  $\alpha$ -форма, 2-ацетиламино-2-дезоксид- $\alpha$ -D-галактопираноза, могут использоваться взаимозаменяемо. Предпочтительно соединения согласно настоящему изобретению содержат  $\beta$ -форму, 2-ацетиламино-2-дезоксид- $\beta$ -D-галактопиранозу.

Таким образом, лиганд может содержать GalNAc.

Лиганд может содержать соединение формулы I:



в которой S представляет собой сахарид, причем указанный сахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин;

X<sup>1</sup> представляет собой C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-алкилен или (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>m</sub>(-CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, где m равно 1, 2 или 3;

P представляет собой фосфат или модифицированный фосфат (предпочтительно тиофосфат);

X<sup>2</sup> представляет собой алкилен или простой алкиленовый эфир формулы (-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, где n=1-6;

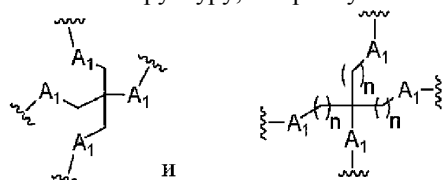
A представляет собой элемент разветвления;

X<sup>3</sup> представляет собой мостиковый элемент;

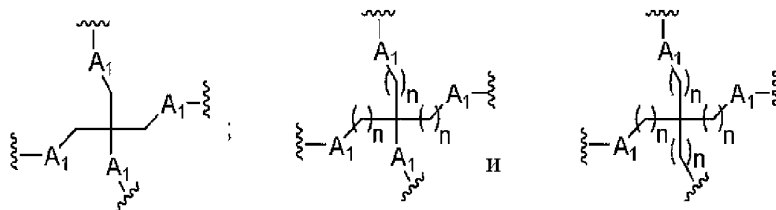
при этом нуклеиновая кислота в соответствии с настоящим изобретением конъюгирована с X<sup>3</sup> за счет фосфата или модифицированного фосфата (предпочтительно тиофосфата).

В формуле (I) элемент разветвления "A" разветвляется на три для размещения трех сахаридных лигандов. Элемент разветвления ковалентно присоединен к оставшимся закрепленным частям лиганда и нуклеиновой кислоты. Элемент разветвления может содержать разветвленную алифатическую группу, содержащую группы, выбранные из алкильной, амидной, дисульфидной, полиэтиленгликолевой, простой эфирной, простой тиоэфирной и гидроксаминной групп. Элемент разветвления может содержать группы, выбранные из алкильной и простой эфирной групп.

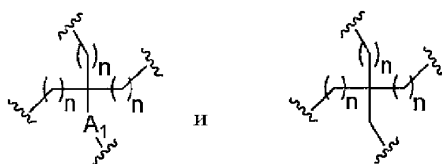
Элемент разветвления A может иметь структуру, выбранную из:



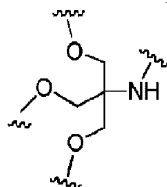
в которой каждый A<sub>1</sub> независимо представляет собой O, S, C=O или NH; и каждый n независимо представляет собой целое число от 1 до 20. Элемент разветвления может иметь структуру, выбранную из:



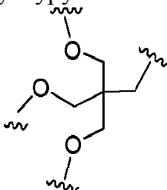
в которой каждый A<sub>1</sub> независимо представляет собой O, S, C=O или NH; и каждый n независимо представляет собой целое число от 1 до 20. Элемент разветвления может иметь структуру, выбранную из:



в которой A<sub>1</sub> представляет собой O, S, C=O или NH; и каждый n независимо представляет собой целое число от 1 до 20. Элемент разветвления может иметь структуру:

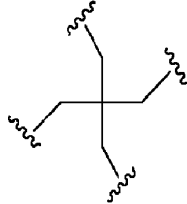


Элемент разветвления может иметь структуру:





Элемент разветвления может иметь структуру:



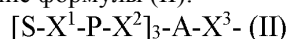
Необязательно элемент разветвления состоит только из атома углерода.

Часть "X<sup>3</sup>" представляет собой мостиковый элемент. Мостиковый элемент является линейным и ковалентно связан с элементом разветвления и нуклеиновой кислотой.

X<sup>3</sup> может быть выбран из -C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкилен-, -C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-алкенилен-, простого алкиленового эфира формулы -(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкилен)-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкилен)-, -C(O)-C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкилен-, -C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>-алкилен(Cy)C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>-алкилен-, где Cy представляет собой замещенное или незамещенное 5 или 6-членное циклоалкиленовое, ариленовое, гетероциклиленовое или гетероариленовое кольцо, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилен-NHC(O)-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилен-, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилен-C(O)NH-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилен-, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилен-SC(O)-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилен-, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилен-C(O)S-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилен-, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилен-OC(O)-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилен-, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилен-C(O)O-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилен-и -C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкилен-S-S-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкилен-.

X<sup>3</sup> может представлять собой простой алкиленовый эфир формулы -(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкилен)-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкилен)-. X<sup>3</sup> может представлять собой простой алкиленовый эфир формулы -(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкилен)-O-(C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub>-алкилен)-, причем указанный (C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub>-алкилен) связан с Z. X<sup>3</sup> может быть выбран из группы, состоящей из -CH<sub>2</sub>-O-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>- и -CH<sub>2</sub>-O-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>-, в частности, -CH<sub>2</sub>-O-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>- и -CH<sub>2</sub>-O-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>-, где в каждом случае группа -CH<sub>2</sub>- соединена с A.

Лиганд может содержать соединение формулы (II):



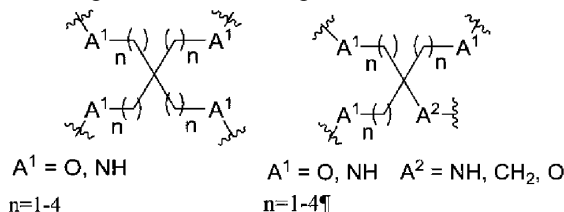
в которой S представляет собой сахарид;

X<sup>1</sup> представляет собой C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-алкилен или (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>m</sub>(-CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, где m равно 1, 2 или 3;

P представляет собой фосфат или модифицированный фосфат (предпочтительно тиофосфат);

X<sup>2</sup> представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкилен;

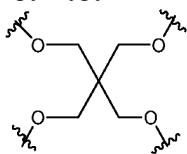
A представляет собой элемент разветвления, выбранный из:



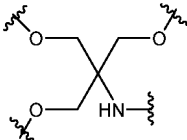
X<sup>3</sup> представляет собой мостиковый элемент;

при этом нуклеиновая кислота в соответствии с настоящим изобретением конъюгирована с X<sup>3</sup> за счет фосфата или модифицированного фосфата (предпочтительно тиофосфата).

Элемент разветвления A может иметь структуру:



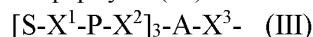
Элемент разветвления A может иметь структуру:



где X<sup>3</sup> присоединен к атому азота.

X<sup>3</sup> может представлять собой C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-алкилен. Предпочтительно X<sup>3</sup> выбран из группы, состоящей из -C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>-, -C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>- и -C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>-, в частности, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>-, -C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>- и -C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>-.

Лиганд может содержать соединение формулы (III):



в которой S представляет собой сахарид;

X<sup>1</sup> представляет собой C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-алкилен или (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>m</sub>(-CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, где m равно 1, 2 или 3;

P представляет собой фосфат или модифицированный фосфат (предпочтительно тиофосфат);

X<sup>2</sup> представляет собой простой алкиленовый эфир формулы -C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-O-CH<sub>2</sub>-;

А представляет собой элемент разветвления;

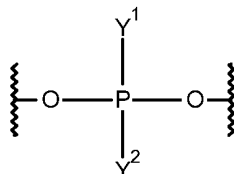
$X^3$  представляет собой простой алкиленовый эфир формулы, выбранной из группы, состоящей из  $-CH_2-O-CH_2-$ ,  $-CH_2-O-C_2H_4-$ ,  $-CH_2-O-C_3H_6-$ ,  $-CH_2-O-C_4H_8-$ ,  $-CH_2-O-C_5H_{10}-$ ,  $-CH_2-O-C_6H_{12}-$ ,  $-CH_2-O-C_7H_{14}-$  и  $-CH_2-O-C_8H_{16}-$ , при этом в каждом случае группа  $-CH_2-$  соединена с А,

и при этом  $X^3$  конъюгирован с нуклеиновой кислотой в соответствии с настоящим изобретением с помощью фосфата или модифицированного фосфата (предпочтительно тиофосфата).

Элемент разветвления может содержать углерод. Предпочтительно элемент разветвления представляет собой углерод.

$X^3$  может быть выбран из группы, состоящей из  $-CH_2-O-C_4H_8-$ ,  $-CH_2-O-C_5H_{10}-$ ,  $-CH_2-O-C_6H_{12}-$ ,  $-CH_2-O-C_7H_{14}-$  и  $-CH_2-O-C_8H_{16}-$ . Предпочтительно  $X^3$  выбран из группы, состоящей из  $-CH_2-O-C_4H_8-$ ,  $-CH_2-O-C_6H_{12}-$  и  $-CH_2-O-C_8H_{16}-$ .

Для любого из вышеуказанных аспектов, если Р представляет собой модифицированную фосфатную группу, Р может быть представлен как:



где  $Y^1$  и  $Y^2$  каждый независимо представляют собой  $=O$ ,  $=S$ ,  $-O^-$ ,  $-OH$ ,  $-SH$ ,  $-BH_3$ ,  $-OCH_2CO_2$ ,  $-OCH_2CO_2R^x$ ,  $-OCH_2C(S)OR^x$  и  $-OR^x$ , где  $R^x$  представляет собой  $C_1-C_6$ -алкил и где  $\text{---}$  указывает на присоединение к остальной части соединения.

Под модифицированным фосфатом подразумевается фосфатная группа, в которой один или более из несоединяющих атомов кислорода замещены. Примеры модифицированных фосфатных групп включают фосфотиоат, фосфоселенаты, боранофосфаты, сложные эфиры боранофосфата, фосфонаты водорода, фосфоамидаты, алкил или арилфосфонаты и сложные фосфотриэфиры. В фосфодитиоатах оба несоединяющих атома кислорода замещены серой. Один, каждый или оба несоединяющих атома кислорода в фосфатной группе могут независимо представлять собой любой из S, Se, B, C, H, N или OR (R представляет собой алкил или арил).

Фосфат также может быть модифицирован путем замещения соединяющего атома кислорода азотом (мостиковые фосфоамидаты), серой (мостиковые фосфотиоаты) и углеродом (мостиковые метиленфосфонаты). Замещение может происходить на концевом атоме кислорода. Возможно замещение несоединяющих атомов кислорода азотом.

Например,  $Y^1$  может представлять  $-OH$ , а  $Y^2$  может представлять  $=O$  или  $=S$ ; или

$Y^1$  может представлять  $-O^-$ , а  $Y^2$  может представлять  $=O$  или  $=S$ ;

$Y^1$  может представлять  $=O$ , а  $Y^2$  может представлять  $-CH_3$ ,  $-SH$ ,  $-OR^x$  или  $-BH_3$ ;

$Y^1$  может представлять  $=S$ , а  $Y^2$  может представлять  $-CH_3$ ,  $OR^x$  или  $-SH$ .

Специалист в данной области техники поймет, что в определенных случаях будет делокализация между  $Y^1$  и  $Y^2$ .

Предпочтительно модифицированная фосфатная группа представляет собой тиофосфатную группу. Тиофосфатные группы включают битиофосфат (т.е. где  $Y^1$  представляет  $=S$  и  $Y^2$  представляет  $-S^-$ ) и монотиофосфат (т.е. где  $Y^1$  представляет  $-O^-$  и  $Y^2$  представляет  $=S$ , или где  $Y^1$  представляет  $=O$  и  $Y^2$  представляет  $-S^-$ ). Предпочтительно Р представляет собой монотиофосфат. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что конъюгаты, имеющие тиофосфатные группы вместо фосфатных групп, обладают улучшенной активностью и продолжительностью действия в условиях *in vivo*.

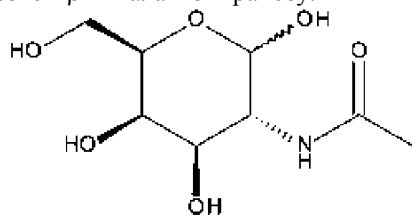
Р также может представлять собой этилфосфат (т.е. где  $Y^1$  представляет собой  $=O$  и  $Y^2$  представляет собой  $OCH_2CH_3$ ).

Сахарид может быть выбран так, чтобы обладать аффинностью в отношении по меньшей мере одного типа рецептора на клетке-мишени. В частности, рецептор находится на поверхности клетки печени млекопитающего, например, печеночный комплекс рецептора асиалогликопротеина (ASGP-R).

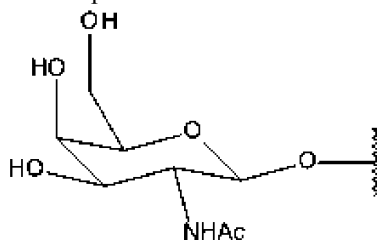
Для любого из вышеуказанных аспектов сахарид может быть выбран из N-ацетила с одним или более из галактозамина, маннозы, галактозы, глюкозы, глюкозамина и фруктозы. Как правило, лиганд для применения в настоящем изобретении может содержать N-ацетилгалактозамин (GalNAc). Предпочтительно соединения согласно настоящему изобретению могут содержать 3 лиганда, каждый из которых будет предпочтительно содержать N-ацетилгалактозамин.

"GalNAc" относится к 2-ацетиламино-2-дезоксид-D-галактопиранозе, обычно называемой в литературе N-ацетилгалактозамином. Ссылка на "GalNAc" или "N-ацетилгалактозамин" включает обе  $\beta$ -форму, 2-ацетиламино-2-дезоксид- $\beta$ -D-галактопиранозу, и  $\alpha$ -форму, 2-ацетиламино-2-дезоксид- $\alpha$ -D-галактопиранозу. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения  $\beta$ -форма, 2-ацетиламино-2-дезоксид- $\beta$ -D-галактопираноза, и  $\alpha$ -форма, 2-ацетиламино-2-дезоксид- $\alpha$ -D-галактопираноза, могут использоваться взаимозаменяемо. Предпочтительно соединения согласно настоящему изобретению содер-

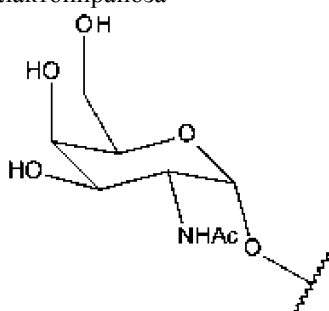
жат  $\beta$ -форму, 2-ацетиламино-2-дезоксид-галактопиранозу.



2-ацетиламино-2-дезоксид-D-галактопираноза



2-ацетиламино-2-дезоксид- $\beta$ -D-галактопираноза

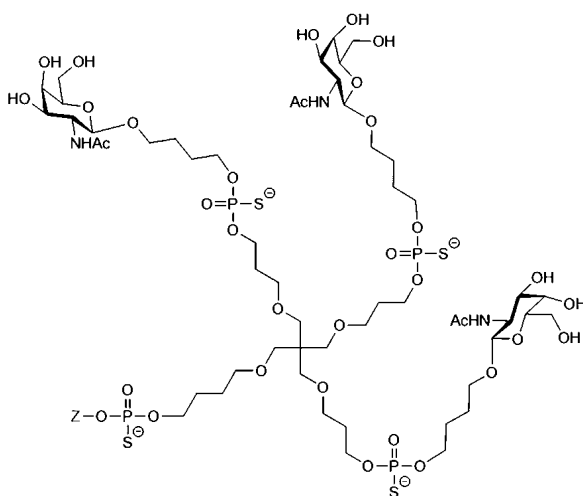
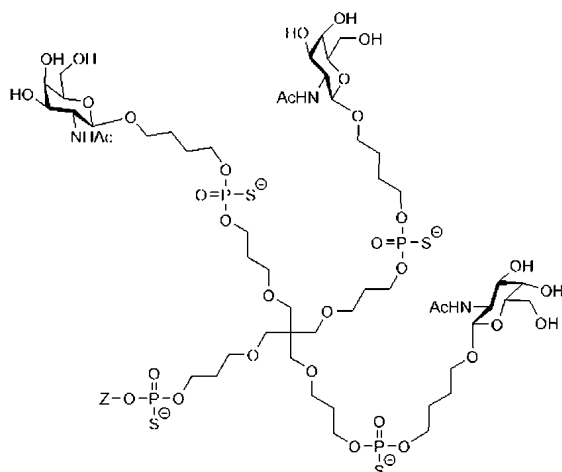
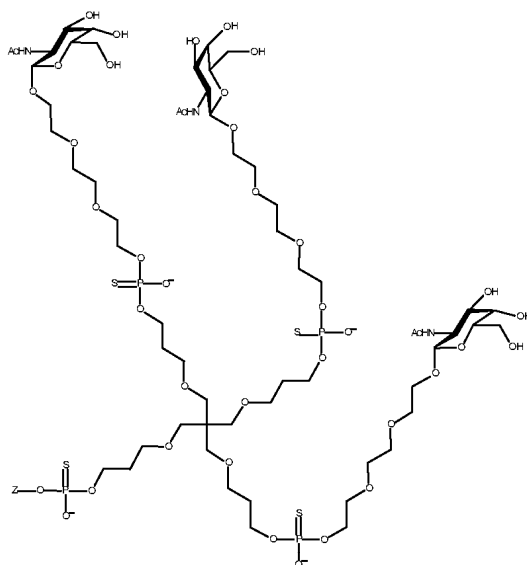


2-ацетиламино-2-дезоксид- $\alpha$ -D-галактопираноза.

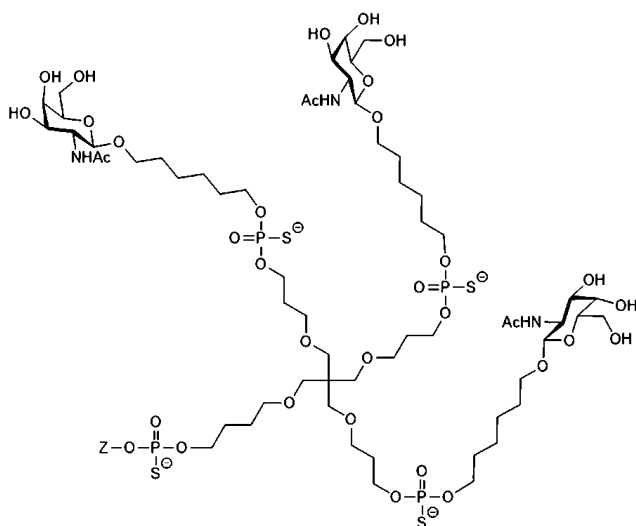
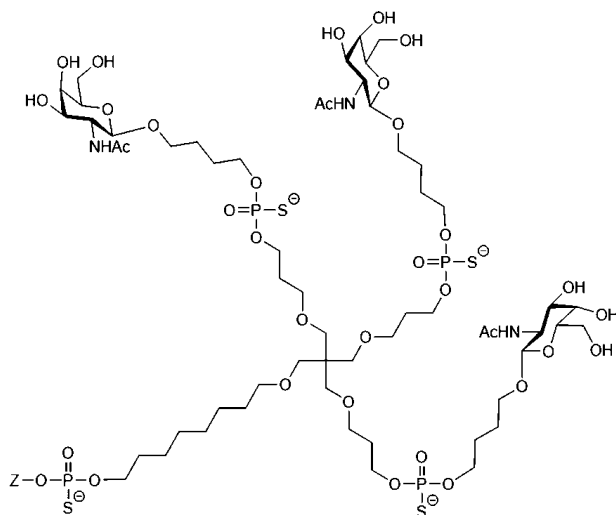
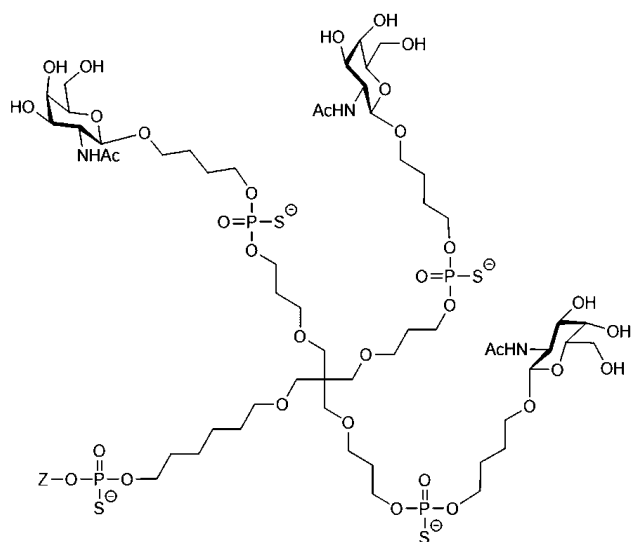
Для любого из вышеуказанных соединений формулы (III)  $X^1$  может представлять собой  $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})(-\text{CH}_2)_2-$ .  $X^1$  может представлять собой  $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_2(-\text{CH}_2)_2-$ .  $X^1$  может представлять собой  $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_3(-\text{CH}_2)_2-$ . Предпочтительно  $X^1$  представляет собой  $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_2(-\text{CH}_2)_2-$ . Согласно другому варианту  $X^1$  представляет собой  $\text{C}_3$ - $\text{C}_6$ -алкилен.  $X^1$  может представлять собой пропилен.  $X^1$  может представлять собой бутилен.  $X^1$  может представлять собой пентилен.  $X^1$  может представлять собой гексилен. Предпочтительно алкил представляет собой линейный алкилен. В частности,  $X^1$  может представлять собой бутилен.

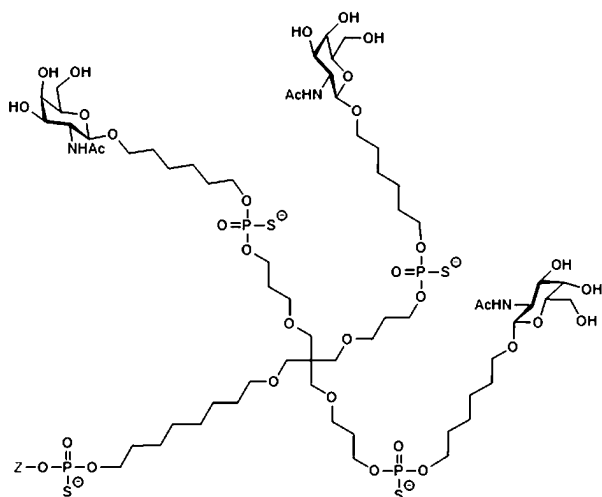
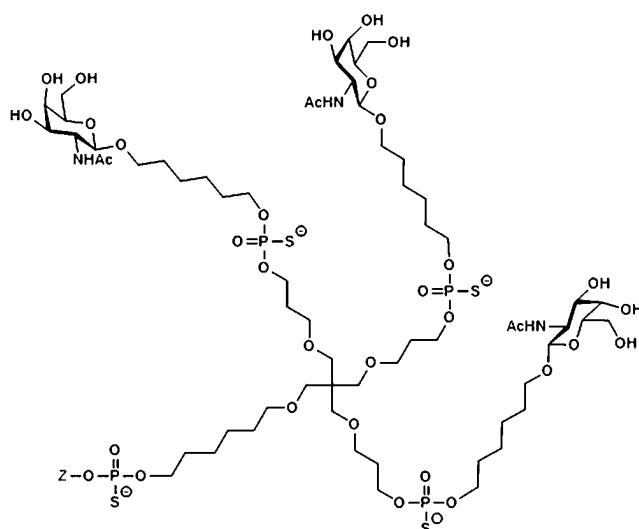
Для соединений формулы (III)  $X^2$  представляет собой простой алкиленовый эфир формулы  $-\text{C}_3\text{H}_6-\text{O}-\text{CH}_2-$ , т.е.  $\text{C}_3$  алкоксиметилен, или  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ .

Согласно настоящему изобретению предложена конъюгированная нуклеиновая кислота, имеющая одну из следующих структур:



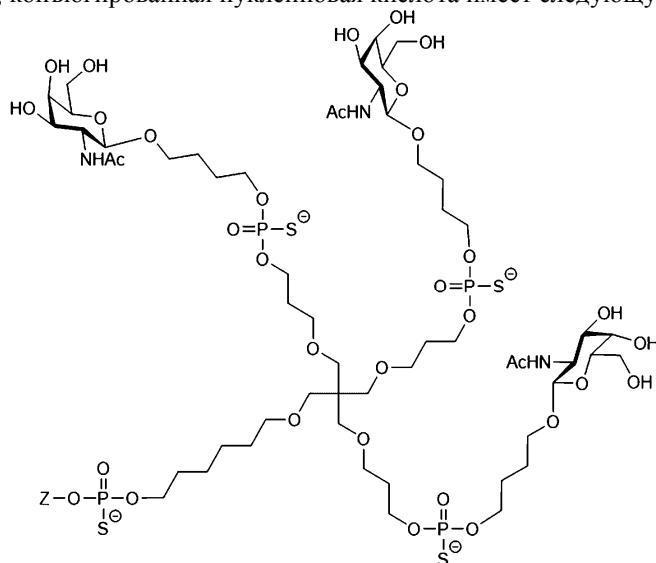
045986





где  $Z$  представляет собой нуклеиновую кислоту, определенную в настоящей заявке ранее, и предпочтительно конъюгирована с 5'-концом второй цепи нуклеиновой кислоты.

Предпочтительно, конъюгированная нуклеиновая кислота имеет следующую структуру:



где  $Z$  представляет собой нуклеиновую кислоту, определенную в настоящей заявке ранее, и предпочтительно конъюгирована с 5'-концом второй цепи.

Лиганд формулы (I), (II) или (III) может быть присоединен на 3'-конце первой (антисмысловой) цепи и/или на любом из 3'- и/или 5'-конца второй (смысловой) цепи. Нуклеиновая кислота может содержать более одного лиганда формулы (I), (II) или (III). Однако предпочтительным является один лиганд формул

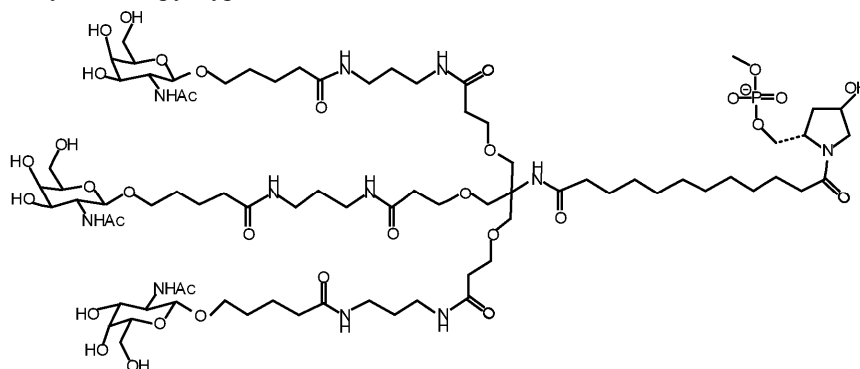
(I), (II) или (III), поскольку одного такого лиганда достаточно для эффективного нацеливания нуклеиновой кислоты на клетки-мишени. Предпочтительно в этом случае, по меньшей мере последние два, предпочтительно по меньшей мере последние три и более предпочтительно по меньшей мере последние четыре нуклеотида на конце нуклеиновой кислоты, к которой присоединен лиганд, связаны фосфодиэфирной связью.

Предпочтительно 5'-конец первой (антисмысловой) цепи не присоединен к лиганду формулы (I), (II) или (III), поскольку лиганд в этом положении потенциально может препятствовать биологической активности нуклеиновой кислоты.

Нуклеиновая кислота с одним лигандом формулы (I), (II) или (III) на 5'-конце цепи имеет более простую структуру и, следовательно, ее дешевле синтезировать, чем аналогичную нуклеиновую кислоту с аналогичным лигандом на 3'-конце. Таким образом, предпочтительно один лиганд любой из формул (I), (II) или (III) ковалентно присоединен (конъюгирован с ним) к 5'-концу второй цепи нуклеиновой кислоты.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота конъюгирована с лигандом, который содержит липид, и более предпочтительно с лигандом, который содержит холестерин.

Альтернативно, нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению может быть конъюгирована с лигандом следующей структуры



Конъюгат согласно настоящему изобретению может содержать любую нуклеиновую кислоту, описанную в настоящей заявке, конъюгированную с любым лигандом или лигандами, описанными в настоящей заявке.

Настоящее изобретение также относится к конъюгату для ингибирования экспрессии гена LPA в клетке, причем указанный конъюгат содержит часть нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеиновую кислоту согласно любому аспекту настоящего изобретения, и по меньшей мере одну часть лиганда, причем указанная часть нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну дуплексную область, которая содержит по меньшей мере часть первой цепи РНК и по меньшей мере часть второй цепи РНК, которая по меньшей мере частично комплементарна первой цепи, причем указанная первая цепь по меньшей мере частично комплементарна по меньшей мере части РНК, транскрибированной с указанного гена LPA, указанная по меньшей мере одна часть лиганда содержит линкерную группу, предпочтительно линкерную группу, происходящую из серинола, а также нацеливающий лиганд для нацеливания в условиях *in vivo* на клетки и конъюгированный исключительно с 3' и/или 5'-концами одной или обеих цепей РНК, причем 5'-конец первой цепи РНК не конъюгирован, при этом:

(i) вторая цепь РНК конъюгирована на 5'-конце с нацеливающим лигандом, и при этом (a) вторая цепь РНК также конъюгирована на 3'-конце с нацеливающим лигандом и 3'-конец первой цепи РНК не конъюгирован; или (b) первая цепь РНК конъюгирована на 3'-конце с нацеливающим лигандом и 3'-конец второй цепи РНК не конъюгирован; или (c) обе вторая цепь РНК и первая цепь РНК также конъюгированы на 3'-концах с нацеливающим лигандом; или

(ii) обе вторая цепь РНК и первая цепь РНК конъюгированы на 3'-концах с нацеливающим лигандом и 5'-конец второй цепи РНК не конъюгирован.

Лиганды могут быть мономерными или мультимерными (например, димерными, тримерными и т.д.).

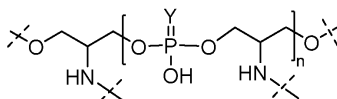
Является приемлемым, когда лиганды являются мономерными и, соответственно, содержат одну группу нацеливающего лиганда, например, одну группу GalNAc.

Согласно другому варианту лиганды могут представлять собой димерные лиганды, в которых части лигандов содержат две линкерные группы, такие как линкерные группы, происходящие из серинола, или линкерные группы, отличные от серинола, каждая из которых соединена с одной группой нацеливающего лиганда.

Лиганды могут представлять собой тримерные лиганды, в которых части лигандов содержат три линкерные группы, такие как линкерные группы, происходящие из серинола, или линкерные группы,

отличные от серинола, каждая из которых соединена с одной группой нацеливающего лиганда.

Две или три линкерные группы, происходящие из серинола, могут быть соединены последовательно, например, как показано ниже:



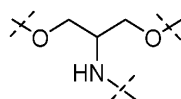
где  $n$  равно 1 или 2, а  $Y$  представляет собой S или O.

Предпочтительно лиганды являются мономерными.

Является приемлемым, когда конъюгированные цепи РНК конъюгируют с нацеливающим лигандом за счет линкерной группы, включая дополнительный линкер, причем указанный дополнительный линкер представляет собой или содержит насыщенную, неразветвленную или разветвленную  $C_{1-15}$  алкильную цепь, при этом необязательно один или более атомов углерода (например, 1, 2 или 3 атома углерода, является приемлемым, когда 1 или 2, в частности, 1), замещены гетероатомом, выбранным из O, N, S(O)<sub>p</sub>, где  $p$  равно 0, 1 или 2 (например, группа  $CH_2$  замещена O или NH, или S, или  $SO_2$ , или группа  $-CH_3$  на конце цепи или на ветви замещена OH или  $NH_2$ ), причем указанная цепь необязательно замещена одной или более оксогруппами (например, 1-3, например, 1 группой).

Является приемлемым, когда линкерная группа представляет собой линкерную группу, происходящую из серинола.

Термин "линкерный фрагмент, происходящий из серинола" означает линкерный фрагмент, содержащий следующую структуру:



Атом O указанной структуры обычно связывается с цепью РНК, и атом N обычно связывается с нацеливающим лигандом.

Является более приемлемым, когда дополнительный линкер содержит насыщенную неразветвленную  $C_{1-15}$  алкильную цепь, в которой один или более атомов углерода (например, 1, 2 или 3 атома углерода, является приемлемым, когда 1 или 2, в частности, 1) замещен(ы) атомом кислорода.

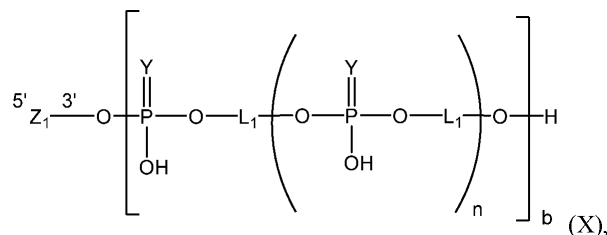
Является более приемлемым, когда дополнительный линкер содержит ПЭГ-цепь.

Является более приемлемым, когда дополнительный линкер содержит насыщенную неразветвленную  $C_{1-15}$  алкильную цепь.

Является более приемлемым, когда дополнительный линкер содержит насыщенную неразветвленную  $C_{1-6}$  алкильную цепь.

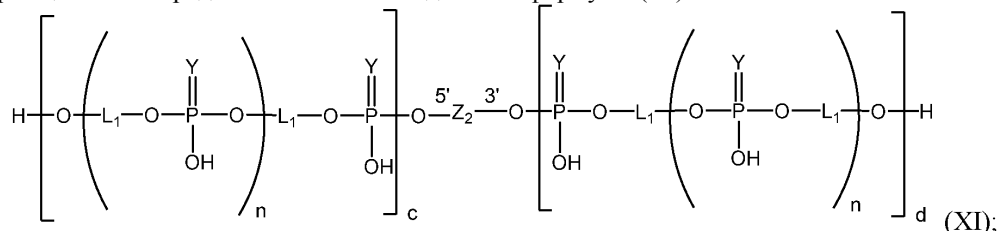
Является более приемлемым, когда дополнительный линкер содержит насыщенную неразветвленную  $C_4$  или  $C_6$  алкильную цепь, например,  $C_4$  алкильную цепь.

Согласно варианту реализации настоящего изобретения первая цепь РНК представляет собой соединение формулы (X):



в которой  $b$  равно 0 или 1; и

вторая цепь РНК представляет собой соединение формулы (XI):



в которой  $c$  и  $d$  независимо равны 0 или 1;

$Z_1$  и  $Z_2$  представляют собой части РНК первой и второй цепей РНК, соответственно;

$Y$  представляет собой O или S;

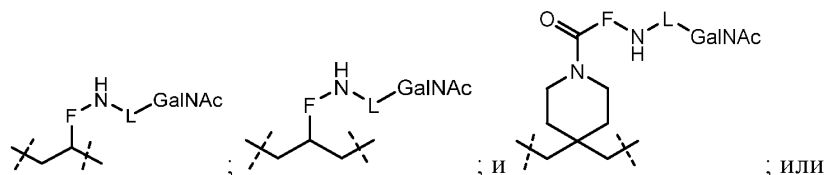
$n$  равно 0, 1, 2 или 3; и

$L_1$  представляет собой линкер, к которому присоединен лиганд;

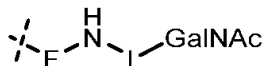
и при этом  $b + c + d$  равно 2 или 3.



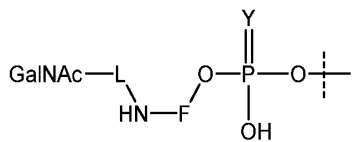




n равно 0 и L<sub>2</sub> представляет собой:



и концевая группа OH отсутствует, так, что образуется следующая группа:



где F представляет собой насыщенную разветвленную или неразветвленную (например, неразветвленную) C<sub>1-8</sub>-алкильную (например, C<sub>1-6</sub>-алкильную) цепь, в которой один из атомов углерода необязательно замещен атомом кислорода, при условии, что указанный атом кислорода отделен от другого гетероатома (например, атома O или N) по меньшей мере 2 атомами углерода;

L является одинаковым или различным в формулах (XII) и (XIII) и выбран из группы, состоящей из:

-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-C(O)-, где r=2-12;

-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>s</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-, где s=1-5;

-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-NH-C(O)-, где t независимо составляет 1-5;

-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-, где u независимо составляет 1-5; и

-(CH<sub>2</sub>)<sub>v</sub>-NH-C(O)-, где v составляет 2-12; и

причем концевой C(O) (если он присутствует) присоединен к группе NH;

и при этом b + c + d равно 2 или 3.

В любой из приведенных выше формул, в которых присутствует GalNAc, GalNAc может быть заменен любым другим нацеливающим лигандом, таким как те, которые упомянуты в настоящей заявке.

Является приемлемым, когда b равно 0, c равно 1 и d равно 1; b равно 1, c равно 0 и d равно 1; b равно 1, c равно 1 и d равно 0; или b равно 1, c равно 1 и d равно 1.

Является более приемлемым, когда b равно 0, c равно 1 и d равно 1; b равно 1, c равно 0 и d равно 1; или b равно 1, c равно 1 и d равно 1.

Является наиболее приемлемым, когда b равно 0, c равно 1 и d равно 1.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения Y представляет собой O. В другом варианте Y представляет собой S.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения R<sub>1</sub> представляет собой H или метил. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения R<sub>1</sub> представляет собой H. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения R<sub>1</sub> представляет собой метил.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения n равно 0, 1, 2 или 3. Является приемлемым, когда n равно 0.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения L выбран из группы, состоящей из:

-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-C(O)-, где r=2-12;

-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>s</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-, где s=1-5;

-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-NH-C(O)-, где t независимо составляет 1-5;

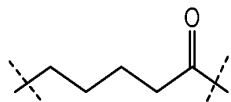
-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-, где u независимо составляет 1-5; и

-(CH<sub>2</sub>)<sub>v</sub>-NH-C(O)-, где v составляет 2-12;

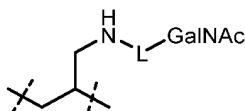
при этом концевой C(O) присоединен к группе NH.

Является приемлемым, когда L представляет собой -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-C(O)-, где r=2-12. Является приемлемым, когда r=2-6. Является более приемлемым, когда r=4 или 6, например, 4.

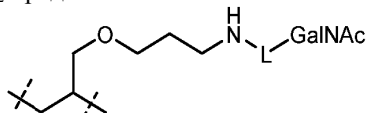
Является приемлемым, когда L представляет собой:



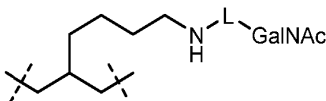
Примерные группы F включают (CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>, например, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>, например, CH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> или (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>, или CH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-3</sub>, например, CH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>. Является приемлемым, когда L<sub>2</sub> представляет собой:



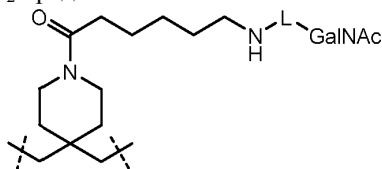
Является приемлемым, когда  $L_2$  представляет собой:



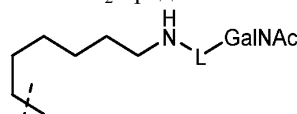
Является приемлемым, когда  $L_2$  представляет собой:



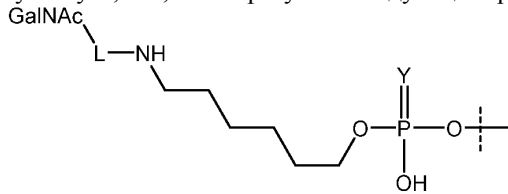
Является приемлемым, когда  $L_2$  представляет собой:



Является приемлемым, когда  $n$  равно 0 и  $L_2$  представляет собой:



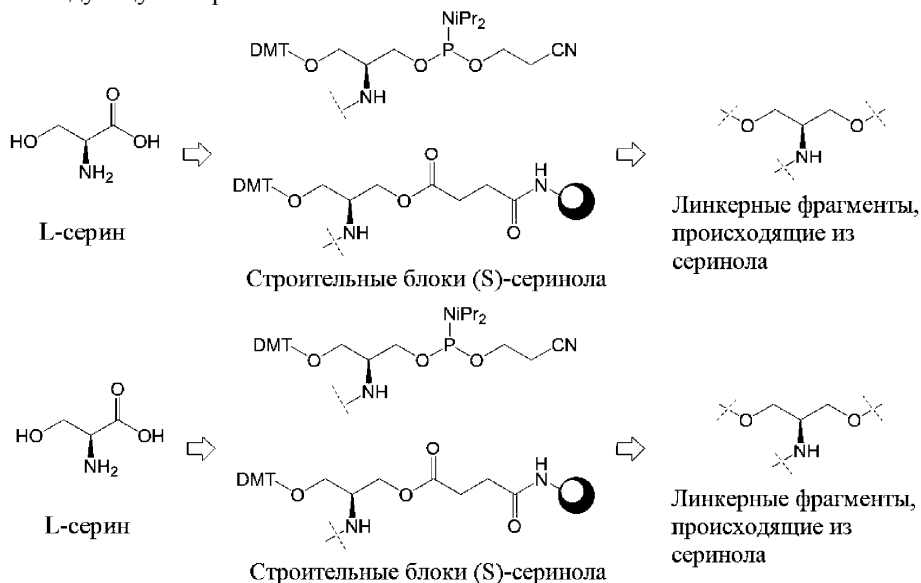
и конечная группа OH отсутствует, так, что образуется следующая группа:



где Y определен в другом месте в настоящей заявке.

Как правило,  $L_2$  внутри группы, заключенной в скобки с индексом b, c и d, является одинаковым.  $L_2$  может быть одинаковым или различным в группах, заключенных в скобки с индексами b, c и d. В варианте реализации  $L_2$  в группе, заключенной в скобки с индексом c, аналогична  $L_2$  в группе, заключенной в скобки с индексом d. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения  $L_2$  в группе, заключенной в скобки с индексом c, отличается от  $L_2$  в группе, заключенной в скобки с индексом d. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения  $L_2$  в группе, заключенной в скобки с индексами b, c и d, является одинаковой, например, когда линкерная группа представляет собой линкерную группу, происходящую из серинола.

Линкерные группы, происходящие из серинола, могут быть основаны на сериноле с любой стереохимией, т.е. происходят из изомера L-серина, изомера D-серина, рацемического серина или другой комбинации изомеров. В предпочтительном аспекте настоящего изобретения группа серинол-GalNAc (SerGN) имеет следующую стереохимию:



т.е. основан на (S)-сериноламидитном или (S)-серинолсукцинатном твердом поддерживаемом строительном элементе, полученном из изомера L-серина.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения клетки-мишени представляют собой гепатоциты.

В одном аспекте предложена нуклеиновая кислота для ингибирования экспрессии LPA в клетке, содержащая по меньшей мере одну дуплексную область, которая содержит по меньшей мере часть первой цепи и по меньшей мере часть второй цепи, которая является по меньшей мере частично комплементарной первой цепи, причем указанная первая цепь по меньшей мере частично комплементарна по меньшей мере части РНК, транскрибированной с гена LPA, причем указанная первая цепь содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 или 43, при этом нуклеиновая кислота конъюгирована с лигандом. Вторая цепь может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 или 44. Нуклеотиды первой и/или второй цепей могут быть модифицированы, как описано в настоящей заявке.

Предпочтительно нуклеиновая кислота содержит SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10, конъюгированные с лигандом формулы (I) (представленной выше), причем указанный лиганд конъюгирован с описанной нуклеиновой кислотой, и при этом первая цепь модифицирована с применением модификации 2'-ОМе на нечетных нуклеотидах и модифицирована с применением 2'-F на четных нуклеотидах, а вторая цепь модифицирована с применением 2'-ОМе на четных нуклеотидах и модифицирована с применением 2'-F на нечетных нуклеотидах.

В частности предложена нуклеиновая кислота, в которой первая цепь содержит или предпочтительно состоит из SEQ ID NO: 165 и вторая цепь необязательно содержит или предпочтительно состоит из SEQ ID NO: 163. Нуклеиновая кислота дополнительно может быть конъюгирована с лигандом. Еще более предпочтительно предложена нуклеиновая кислота, в которой первая цепь содержит или предпочтительно состоит из SEQ ID NO: 165 и вторая цепь необязательно содержит или предпочтительно состоит из SEQ ID NO: 164. Наиболее предпочтительно предложена мРНК, которая состоит из SEQ ID NO: 165 и SEQ ID NO: 164. Один аспект настоящего изобретения представляет собой конъюгат 21.

#### **Композиции, применение и способы**

Согласно настоящему изобретению также предложены фармацевтические композиции, содержащие нуклеиновую кислоту или конъюгированную нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению. Фармацевтические композиции можно применять в качестве лекарственных средств или в качестве диагностических агентов, отдельно или в комбинации с другими агентами. Например, один или более конъюгатов нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению можно комбинировать со средством для доставки (например, липосомами) и/или вспомогательными веществами, такими как носители, разбавители. Также могут быть добавлены другие агенты, такие как консерванты и стабилизаторы. Способы доставки нуклеиновых кислот известны в данной области техники и известны специалисту в данной области техники.

Настоящее изобретение также включает фармацевтическую композицию, содержащую одну или более нуклеиновых кислот или конъюгированных нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением в физиологически/фармацевтически приемлемом вспомогательном веществе, таком как стабилизатор, консервант, разбавитель, буфер и тому подобное.

Фармацевтическая композиция может представлять собой стерильную инъекруемую водную суспензию или раствор, или может быть в лиофилизированной форме, или может быть прикреплена, абсорбирована или включена в любое другое подходящее галеновое транспортирующее вещество или внутрь его, такое как драже, таблетки, капсулы, наночастицы, гели, таблетки, гранулы или сходные структуры.

Один аспект относится к двухцепочечной нуклеиновой кислоте, которая способна ингибировать экспрессию LPA, предпочтительно в клетке, для применения в качестве лекарственного средства.

Дополнительный аспект изобретения относится к нуклеиновой кислоте или конъюгированной нуклеиновой кислоте согласно изобретению или к фармацевтической композиции, содержащей нуклеиновую кислоту или конъюгированную нуклеиновую кислоту согласно изобретению, для применения в лечении заболевания, расстройства или синдрома, предпочтительно, заболевания, расстройства или синдрома, связанного с повышенным уровнем Lp(a)-содержащих частиц. Лечение может быть направлено на предотвращение и/или снижение риска возникновения и/или лечения инсульта, атеросклероза, тромбоза или сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца или стеноз аорты, и любого другого заболевания или патологии, связанных с повышенным уровнем Lp(a)-содержащих частиц. Лечение может быть направлено на предотвращение и/или снижение риска возникновения и/или лечение кальцинированного аортального стеноза, ишемического инсульта, ишемической болезни сердца, заболевания периферических артерий, аневризмы брюшной аорты, сердечной недостаточности, вторичной по отношению к ишемической кардиомиопатии, или семейной гиперхолестеринемии, предпочтительно, когда заболевание связано с повышенными уровнями Lp(a)-содержащих частиц. Предпочтительно лечение направлено на предотвращение и/или снижение

риска возникновения и/или лечение стеноза аорты, такого как кальцинированный аортальный стеноз, или семейной гиперхолестеринемии, предпочтительно в каждом из этих случаев, когда заболевание или расстройство связано с повышенным уровнем Lp(a)-содержащих частиц. Желательный уровень Lp(a)-содержащих частиц в сыворотке обычно описывается как уровень ниже 14 мг/дл. Повышенный уровень Lp(a)-содержащих частиц составляет по меньшей мере 14, предпочтительно по меньшей мере 20, более предпочтительно по меньшей мере 30, более предпочтительно по меньшей мере 40 и наиболее предпочтительно по меньшей мере 50 мг/дл Lp(a)-содержащих частиц в сыворотке субъекта.

Настоящее изобретение также включает фармацевтическую композицию, содержащую одну или более нуклеиновых кислот или конъюгированных нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим изобретением в физиологически/фармацевтически приемлемом вспомогательном веществе, таком как стабилизатор, консервант, разбавитель, буфер и тому подобное.

Термины "Lp(a)-содержащие частицы" и "Lp(a) частицы" используются взаимозаменяемо во всей настоящей заявке.

Фармацевтические композиции и лекарственные средства согласно настоящему изобретению могут быть введены субъекту-млекопитающему в фармацевтически эффективной дозе. Млекопитающее может быть выбрано из человека, примата, отличного от человека, обезьяны или древесного примата, собаки, кошки, лошади, крупного рогатого скота, свиньи, козы, овцы, мыши, крысы, хомяка, ежа и морской свинки или других целесообразных видов. Исходя из этого, в настоящей заявке формулировка "LPA" или "LPA" обозначает нуклеиновую кислоту или белок в любом из вышеупомянутых видов, если они экспрессируются у него естественным или искусственным образом, но предпочтительно эта формулировка обозначает нуклеиновые кислоты или белки человека. Нуклеиновую кислоту или конъюгированную нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению также можно вводить для применения в комбинации с другими терапевтическими соединениями, либо вводить по отдельности, либо одновременно, например, в виде комбинированной стандартной дозы. Дополнительный терапевтический агент может быть выбран из группы, включающей олигонуклеотид, небольшую молекулу, моноклональное антитело, поликлональное антитело и пептид. Также возможна молекулярная конъюгация с другими биологически активными молекулярными частицами, такими как пептиды, клеточные или искусственные лиганды или малые и большие молекулы.

Уровни дозировки для лекарственного средства и фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению могут быть определены специалистами в данной области техники с помощью стандартных экспериментов. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения стандартная доза может содержать от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг массы тела нуклеиновой кислоты или конъюгированной нуклеиновой кислоты. Согласно другому варианту доза может составлять от 10 мг/кг до 25 мг/кг массы тела или от 1 мг/кг до 10 мг/кг массы тела, или от 0,05 мг/кг до 5 мг/кг массы тела, или от 0,1 мг/кг до 5 мг/кг массы тела, или от 0,1 мг/кг до 1 мг/кг массы тела, или от 0,1 мг/кг до 0,5 мг/кг массы тела, или от 0,5 мг/кг до 1 мг/кг массы тела. Согласно другому варианту доза может составлять от примерно 0,5 мг/кг до примерно 10 мг/кг массы тела, или от примерно 0,6 мг/кг до примерно 8 мг/кг массы тела, или от примерно 0,7 мг/кг до примерно 5 мг/кг массы тела, или от примерно 0,8 мг/кг до примерно 4 мг/кг массы тела, или от примерно 0,9 мг/кг до примерно 3,5 мг/кг массы тела, или от примерно 1 мг/кг до примерно 3 мг/кг массы тела, или примерно 1 мг/кг массы тела, или примерно 3 мг/кг массы тела, где "примерно" представляет собой отклонение до 30%, предпочтительно до 20%, более предпочтительно до 10%, но все же более предпочтительно до 5% и наиболее предпочтительно 0% от указанного значения. Уровни дозировки также можно рассчитать с помощью других параметров, таких как, например, площадь поверхности тела. Нуклеиновая кислота, описанная в настоящей заявке, может быть способна ингибировать экспрессию LPA. Нуклеиновая кислота, описанная в настоящей заявке, может быть способна частично ингибировать экспрессию LPA. Ингибирование может быть полным, т.е. 0% по сравнению с уровнем экспрессии LPA в отсутствие нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. Ингибирование экспрессии LPA может быть частичным, т.е. оно может составлять 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или промежуточные значения от экспрессии LPA в отсутствие нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. Ингибирование может длиться 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель или до 3 месяцев при применении у субъекта, такого как пациент-человек. Нуклеиновую кислоту или конъюгированную нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению или композиции, содержащие ее, можно применять в схеме, включающей обработки один или два раза в неделю, каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели, каждые четыре недели, каждые пять недель, каждые шесть недель, каждые семь недель или каждые восемь недель, или в схемах с различной частотой дозирования, таких как комбинации вышеупомянутых интервалов. Нуклеиновую кислоту можно применять для подкожного, внутривенного или любого другого способа введения, такого как пероральный, ректальный или внутривенный, предпочтительно для подкожного применения.

В клетках и/или у субъектов, обработанных или получающих нуклеиновую кислоту или конъюгированную нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению, экспрессия LPA может ингибироваться по сравнению с необработанными клетками и/или субъектами на величину в диапазоне от 15% до

100%, но по меньшей мере приблизительно 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% или промежуточные значения. Уровень ингибирования может обеспечить лечение заболевания, ассоциированного с экспрессией или сверхэкспрессией LPA, или может служить для дальнейшего изучения функций и физиологических ролей продукта гена LPA.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к нуклеиновой кислоте или конъюгированной нуклеиновой кислоте согласно настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения заболевания, нарушения или синдромов, таких как те, которые перечислены выше, или дополнительных патологий, ассоциированных с повышенными уровнями Lp(a), или при дополнительных терапевтических подходах, когда желательным является ингибирование экспрессии LPA.

Настоящее изобретение также включает способ лечения или предотвращения заболевания, нарушения или синдрома, таких как те, которые перечислены выше, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей нуклеиновую кислоту или конъюгированную нуклеиновую кислоту, описанные в настоящей заявке, индивидууму, нуждающемуся в лечении (чтобы улучшить такие патологии). Композицию нуклеиновой кислоты можно вводить по схеме, включающей обработки два раза в неделю, один раз в неделю, каждые две недели, каждые три недели, каждые четыре недели, каждые пять недель, каждые шесть недель, каждые семь недель или каждые восемь недель или с интервалом введения более чем один раз каждые восемь недель, или в схемах с различной частотой дозирования, таких как комбинации вышеупомянутых интервалов. Нуклеиновая кислота или конъюгированная нуклеиновая кислота могут быть предназначены для подкожного или внутривенного введения или других способов введения, таких как пероральный, ректальный или внутривенный. Предпочтительно нуклеиновую кислоту или конъюгированную нуклеиновую кислоту вводят подкожно.

Нуклеиновую кислоту или конъюгированную нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению можно получить с применением обычных способов в данной области техники, включая химический синтез или экспрессию нуклеиновой кислоты как в условиях *in vitro* (например, прерванная транскрипция), так и в условиях *in vivo*. Например, с применением твердофазного химического синтеза или с применением вектора экспрессии на основе нуклеиновой кислоты, включая вирусные производные или частично или полностью синтетические системы экспрессии. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вектор экспрессии можно применять для получения нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению в условиях *in vitro*, внутри промежуточного организма-хозяина или типа клетки, внутри промежуточного или конечного организма или внутри желаемой клетки-мишени. Способы получения (синтеза или ферментативной транскрипции) нуклеиновой кислоты, описанные в настоящей заявке, известны специалистам в данной области техники.

Все признаки нуклеиновых кислот могут быть объединены со всеми другими аспектами изобретения, описанного в настоящей заявке.

Настоящее изобретение также относится к немодифицированным последовательностям всех модифицированных последовательностей, раскрытых в настоящей заявке.

Настоящее изобретение будет далее описано со ссылкой на следующие неограничивающие чертежи и примеры.

### Чертежи

На фиг. 1 показаны результаты скрининга неконъюгированной молекулы миРНК в отношении ингибирования экспрессии мРНК LPA в клетках RT-4 человека.

На фиг. 2A и 2B показан дозозависимый ответ неконъюгированных нацеленных на LPA молекул миРНК на экспрессию мРНК LPA в клетках RT-4 человека.

На фиг. 3 показано ингибирование экспрессии мРНК LPA в первичных гепатоцитах человека и яванских макаков различными дозами GalNAc-L1 LPA-1038-конъюгированных молекул миРНК, доставленных путем опосредуемого рецепторами поглощения.

На фиг. 4 показаны типичные примеры выключения мРНК LPA с помощью указанных L6-конъюгированных GalNAc миРНК в первичных гепатоцитах человека, доставленных путем опосредуемого рецепторами поглощения.

На фиг. 5 показан синтез A0268, который представляет собой одноцепочечный олигонуклеотид, конъюгированный на 3'-конце с моно-GalNAc, и является исходным материалом при синтезе конъюгата 1 и конъюгата 3. (ps) обозначает фосфотиоатную связь.

На фиг. 6 показан синтез A0006, который представляет собой одноцепочечный олигонуклеотид, конъюгированный на 5'-конце с трехантенным GalNAc, применяемый для синтеза эталонного конъюгата 4. (ps) обозначает фосфотиоатную связь.

На фиг. 7 проиллюстрировано определение выключения TTR в условиях *in vitro*. В частности, на фиг. 7A показано определение выключения TTR в условиях *in vitro* с помощью эталонных конъюгатов (RC) 1 и 3, а также необработанного контроля "UT"; на фиг. 7B показано определение выключения TTR в условиях *in vitro* с помощью эталонных конъюгатов (RC) 2 и 3, а также необработанного контроля "UT"; и на фиг. 7C показано определение выключения TTR в условиях *in vitro* с помощью конъюгатов 1, 2 и 3, а также с помощью RC3 и необработанного контроля "UT". Эталонные конъюгаты 1 и 2 представляют собой конъюгаты для сравнения. Эталонный конъюгат 3 представляет собой ненацеливающую GalNAc

миРНК, а "необработанный" ("UT") представляет необработанные клетки. Оба RC3 и UT являются отрицательными контролями. Уровни мРНК были нормированы против PtenII.

На фиг. 8 показана временная динамика сывороточного TTR в когортах мышей C57BL/6 с n=4 через 7, 14 и 27 дней после обработки путем подкожного введения 1 мг/кг - конъюгаты 1-3, эталонные конъюгаты (RC) 1, 2 и 4 и индивидуумы с имитированной обработкой (ФСБ).

На фиг. 9 показан синтез олигонуклеотидов из предшественников олигонуклеотидов, конъюгированных с GalNAc на 3' и 5'-концах (таких как соединение X0385B-prec).

На фиг. 10 показан равный дозозависимый ответ выключения для миРНК, нацеленной на LPA, с двумя отдельными элементами GalNAc, конъюгированными со второй цепью, по сравнению с трехантенным элементом GalNAc на 5' второй цепи, в первичных гепатоцитах яванского макака.

На фиг. 11 проиллюстрировано определение выключения TTR в условиях *in vitro*. В частности, на фиг. 11A показано определение выключения TTR в условиях *in vitro* с помощью конъюгатов 4, 5, 6 и 2 по сравнению с "Luc" (эталонный конъюгат 3), а также необработанным контролем "UT"; на фиг. 11B показано определение выключения TTR в условиях *in vitro* с помощью конъюгатов 7 и 2 по сравнению с "Luc" (эталонный конъюгат 3), а также необработанным контролем "UT". Luc или эталонный конъюгат 3 (RC3) представляет собой ненацеливающую GalNAc миРНК, а "необработанный" ("UT") представляет необработанные клетки. Оба RC3 и UT являются отрицательными контролями. Уровень мРНК был нормирован против PtenII.

На фиг. 12 проиллюстрировано определение выключения TTR в условиях *in vitro*. В частности, на фиг. 12A показано определение выключения TTR в условиях *in vitro* с помощью конъюгатов 8, 9, 10, 11 и 2 по сравнению с "Luc" (эталонный конъюгат 3), а также необработанным контролем "UT"; на фиг. 12B показано определение выключения TTR в условиях *in vitro* с помощью конъюгатов 12 и 2 по сравнению с "Luc" (эталонный конъюгат 3), а также необработанным контролем "UT". Luc или эталонный конъюгат 3 представляет ненацеливающую GalNAc миРНК, а "необработанный" ("UT") представляет необработанные клетки. Оба RC3 и UT являются отрицательными контролями. Уровень мРНК был нормирован против PtenII.

На фиг. 13 проиллюстрировано определение выключения мРНК LPA в условиях *in vitro* с помощью конъюгата 19 по сравнению с контролями. Ctr представляет ненацеливающую GalNAc миРНК, а "необработанный" ("UT") представляет необработанные клетки. Оба Ctr и UT являются отрицательными контролями. Уровень мРНК был нормирован против ACTB.

На фиг. 14 показана временная динамика уровней мРНК Aldh2 печени в когортах мышей C57BL/6 с n=6 через 14, 28 и 42 дня после обработки путем подкожного введения 1 мг/кг - конъюгат 15, эталонный конъюгат (RC) 6 и индивидуумы с имитированной обработкой (ФСБ). Уровень мРНК нормировали против Pten.

На фиг. 15 показана временная динамика уровней мРНК Aldh2 печени в когортах мышей C57BL/6 с n=6 через 14, 28 и 42 дня после обработки путем подкожного введения 1 мг/кг - конъюгат 16, эталонный конъюгат (RC) 7 и индивидуумы с имитированной обработкой (ФСБ). Уровень мРНК нормировали против Pten.

На фиг. 16 показана временная динамика уровней мРНК Tmprss6 печени в когортах мышей c57BL/6 с n=6 через 14, 28 и 42 дня после обработки путем подкожного введения 1 мг/кг - конъюгат 18, эталонный конъюгат (RC) 8 и индивидуумы с имитированной обработкой (ФСБ). Уровень мРНК нормировали против Pten.

На фиг. 17 показана стабильность в сыворотке конъюгатов 4, 5, 6, 7 и 2, а также необработанного контроля (UT) при 37°C в течение 3 дней.

На фиг. 18 показана стабильность в сыворотке конъюгатов 8, 9, 10, 11, 12 и 2, а также необработанного контроля (UT) при 37°C в течение 3 дней.

На фиг. 19 показано снижение мРНК LPA в первичных гепатоцитах человека с помощью Конъюгата 21.

На фиг. 20 показано уменьшение мРНК LPA в первичных гепатоцитах яванского макака с помощью Конъюгата 21.

На фиг. 21 показано, что Конъюгат 21 не влияет на уровень экспрессии гена APOB.

На фиг. 22 показано, что Конъюгат 21 не влияет на уровень экспрессии гена PLG.

На фиг. 23 показано время ингибирования сывороточного Lp(a) в течение 29 дней у яванского макака с помощью различных доз конъюгата 21.

На фиг. 24 показана кривая доза-ответ конъюгата 21, показывающая снижение сывороточного Lp(a) на 29 день у яванского макака.

### Примеры

Нумерация, упомянутая в каждом примере, является конкретной для упомянутого примера.

Пример 1.

Количества модифицированных и конъюгированных молекул мРНК, применяемые для функциональных примеров, приведены в настоящей заявке.

Производные LPA-1038:

GalNAc-LPA-1038-L1

Первая цепь (SEQ ID NO: 119, на основании SEQ ID NO: 5)

OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeA 3'

Вторая цепь (SEQ ID NO: 120, на основании SEQ ID NO: 6)

5'[ST23 (ps)]<sub>3</sub> длинный утроитель (ps)FU-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU 3'

GalNAc-LPA-1038-L6

Первая цепь (SEQ ID NO: 121, на основании SEQ ID NO: 5)

OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeA 3'

Вторая цепь (SEQ ID NO: 122, на основании SEQ ID NO: 6)

5'[ST23 (ps)]<sub>3</sub> ST43 (ps)FU-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU 3'

FN (N=A, C, G, U) обозначает 2'-фтор, 2'-дезоксинуклеозиды

OMeN (N=A, C, G, U) обозначает 2'-О-метилнуклеозиды

(ps) обозначает фосфотиоатную связь

ST23 и ST43 представлены ниже.

Дополнительным примером являются производные LPA 1041:

GalNAc-LPA-1041-L1

Первая цепь (SEQ ID NO: 123, на основании SEQ ID NO: 9)

5' OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeG 3'

Вторая цепь (SEQ ID NO: 124, на основании SEQ ID NO: 10)

5'[ST23 (ps)]<sub>3</sub> длинный утроитель (ps) FC-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU 3'

GalNAc-LPA-1041-L6

Первая цепь (SEQ ID NO: 125, на основании SEQ ID NO: 9)

5' OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeG 3'

Вторая цепь (SEQ ID NO: 126, на основании SEQ ID NO: 10)

5'[ST23 (ps)]<sub>3</sub> ST43 (ps) FC-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU 3'

FN (N=A, C, G, U) обозначает 2'-фтор, 2'-дезоксинуклеозиды

OMeN (N=A, C, G, U) обозначает 2'-О-метилнуклеозиды

(ps) обозначает фосфотиоатную связь

Все олигонуклеотиды либо получали от коммерческих производителей олигонуклеотидов (Viospring, Франкфурт, Германия, или RiboBio, Гуанчжоу, Гуандун, КНР), либо синтезировали на синтезаторе АКТА oligopilot (самостоятельно) с применением стандартных фосфоамидитных реакций. Применяли коммерчески доступную твердую подложку и 2'-О-метил-РНК-фосфоамидиты, 2'-фтор-ДНК-



фосфоамидиты (все со стандартной защитой) и коммерчески доступный длинный утробительный фосфоамидит (Glen research). Синтез выполняли с применением 0,1 М растворов фосфоамидита в сухом ацетонитриле, а в качестве активатора применяли бензилтиотетразол (БТТ) (0,3 М в ацетонитриле). Все остальные реагенты представляли собой коммерчески доступные стандартные реагенты.

Конъюгацию соответствующего синтона GalNAc (например, ST23, ST41 или ST43) осуществляли путем связывания соответствующего фосфоамидита с 5'-концом олигоцепи в стандартных условиях связывания фосфоамидита. Фосфотиоаты вводили с применением стандартных коммерчески доступных реагентов для тиолирования (EDITH, Link technologies).

Одиночные цепи отщепляли от CPG с применением метиламина (40% водн.) и полученный неочищенный олигонуклеотид очищали с помощью ионообменной хроматографии (Resource Q, 6 мл, GE Healthcare) на системе для ВЭЖХ АКТА Pure с применением градиента хлорида натрия. Содержащие продукт фракции объединяли, обессоливали на колонке для гель-проникающей хроматографии (Zetadex, EMP Biotech) и лиофилизировали.

Для ренатурации эквивалентные количества соответствующих одиночных цепей растворяли в воде и нагревали до 80°C в течение 5 мин. После постепенного охлаждения до комнатной температуры полученный дуплекс лиофилизировали.

Последовательности полученных нуклеиновых кислот (миРНК) приведены в табл. 1 ниже.

Таблица 1

Последовательности неконкюгированных нуклеиновых кислот, испытанные в отношении ингибирования экспрессии мРНК LPA. Указаны последовательности и применяемый профиль модификации

SEQ ID NO:	Идентиф. миРНК	Цепь	Последовательность	Модификации
1	LPA-1014	первая цепь	5'ucguauaacaauaaggggc 3'	5381616272616284847
2		вторая цепь	5'gccccuuauuguuuauacga 3'	4737351615451616382
3	LPA-1024	первая цепь	5'gauaacucuguccauuacc 3'	8252635354537251637
4		вторая цепь	5'gguaauggacagauuauac 3'	4816254827282815253
5	LPA-1038	первая цепь	5'auaacucuguccauuacca 3'	6162717181736152736
6		вторая цепь	5'ugguaauggacagauuau 3'	1845261846364645161
7	LPA-1040	первая цепь	5'uaacucuguccauuaccgu 3'	5263535453725163745
8		вторая цепь	5'acgguaauggacagauuau 3'	2748162548272828152
9	LPA-1041	первая цепь	5'auaacucuguccauuaccg 3'	6162717181736152738

10		вторая цепь	5'cgguaauggacagaguau 3'	3845261846364645161
11	LPA-1055	первая цепь	5'agaaugugccucgauaacu 3'	6462545473538252635
12		вторая цепь	5'aguuaucgaggcacauucu 3'	2815253828472725171
13	LPA-1057	первая цепь	5'auaacucuguccaucacca 3'	6162717181736172736
14		вторая цепь	5'uggugauggacagaguau 3'	1845461846364645161
15	LPA-1058	первая цепь	5'auaacucuguccaucaccu 3'	6162717181736172735
16		вторая цепь	5'aggugauggacagaguau 3'	2845461846364645161
17	LPA-1061	первая цепь	5'uaacucuguccauuaccuu 3'	5263535453725163725
18		вторая цепь	5'augguaauggacagaguua 3'	2548162548272828152
19	LPA-1086	первая цепь	5'augugccuugauaacucug 3'	6181837154616271718
20		вторая цепь	5'cagaguuaucaggcacau 3'	3646451617264836361
21	LPA-1099	первая цепь	5'aguuggugcugcuucagaa 3'	6451845471835172826
22		вторая цепь	5'uucugaagcagcaccuacu 3'	1535462836472736271
23	LPA-1102	первая цепь	5'auaaggggcugccacagg 3'	6252648483547363648
24		вторая цепь	5'ccuguggcagccuuuuu 3'	3718184728373715251
25	LPA-1116	первая цепь	5'uaacucuguccaucaccu 3'	5263535453725363725
26		вторая цепь	5'auggugauggacagaguua 3'	2548182548272828152
27	LPA-1127	первая цепь	5'augagccucgauaacucug 3'	6182837174616271718
28		вторая цепь	5'cagaguuaucgaggcucau 3'	3646451617464835361
29	LPA-1128	первая цепь	5'aaugagccucgauaacucu 3'	6254647353825263535
30		вторая цепь	5'agaguuaucgaggcucauu 3'	2828152538284717251
31	LPA-1141	первая цепь	5'aaugcuuccaggacauuuc 3'	6254715372846361517
32		вторая цепь	5'gaaauguccuggaagcauu 3'	4626181735482647251
33	LPA-1151	первая цепь	5'acagugggagaaugugc 3'	6364548184646254547
34		вторая цепь	5'gcacauuuccaccacugu 3'	4727251717363727181
35	LPA-1171	первая цепь	5'guaugugccucgauaacuc 3'	8161818371746162717
36		вторая цепь	5'gaguuaucgaggcacauac 3'	4645161746483636163
37	LPA-1177	первая цепь	5'ucgauaacucuguccauca 3'	5382526353545372536
38		вторая цепь	5'ugauggacagaguuaucga 3'	1825482728281525382
39	LPA-1189	первая цепь	5'ugucacuggacauuguguc 3'	5453635482725181817
40		вторая цепь	5'gacacaauuccagugaca 3'	4636362545372818272
41	LPA-1244	первая цепь	5'cugggauccaugguguaac 3'	7184825372548181627
42		вторая цепь	5'guuacaccauggaucccag 3'	4516363725482537364
43	LPA-1248	первая цепь	5'agaugaccaagcuuggcag 3'	6461827362835184728
44		вторая цепь	5'cugccaagcuuggucaucu 3'	3547362835184536171

Таблица 1. Модификации нуклеотидов обозначены следующими номерами (колонка 4), 1=2'F-dU, 2=2'F-dA, 3=2'F-dC, 4=2'F-dG, 5=2'-OMe-rU; 6=2'-OMe-rA; 7=2'-OMe-rC; 8=2'-OMe-rG.

Таблица 2. Последовательности наборов ампликонов кПЦР LPA, APOB, бета-актина и Pten, которые применяли для измерения уровней мРНК, показаны ниже.

Таблица 2

Ген	Вид	Последовательности	SEQ ID NO:
LPA: (верхний)	Человек	5' AAGTGCCTTGCGACGTCC 3'	45
LPA: (нижний)		5' CCTGGACTGTGGGGCTTT 3'	46
LPA: (зонд)		5' CTGTTTCTGAACAAGCACCAACGGAGC 3'	47
LPA (верхний)	Яванский макак	5' GTGTCCTCGCAACGTCCA 3'	48
LPA (нижний)		5' GACCCCGGGGCTTTG 3'	49
LPA (зонд)		5'TGGCTGTTTCTGAACAAGCACCAATGG 3'	50
АРОВ (верхний)	Человек	5' TCATTCCTCCCAAAGAGACC 3'	51
АРОВ (нижний)		5' CACCTCCGTTTTGGTGGTAGAG 3'	52
АРОВ (зонд)		5' CAAGCTGCTCAGTGGAGGCAACACATTA 3'	53
Бета-актин (верхний)	Человек	5' GCATGGGTCAGAAGGATTCCTAT 3'	54
Бета-актин (нижний)		5' TGTAGAAGGTGTGGTGCCAGATT 3'	55
Бета-актин (зонд)		5' TCGAGCACGGCATCGTCACCAA 3'	56
Бета-актин (верхний)	Яванский макак	5' AAGCCAACCGCGAGAAG 3'	57
Бета-актин (нижний)		5' AGAGGCGTACAGGGACAGCA 3'	58
Бета-актин (зонд)		5' TGAGACCTTCAACACCCAGCCATGTAC 3'	59
РРІВ (верхний)	Человек	5' AGATGTAGGCCGGGTGATCTTT 3'	60
РРІВ (нижний)		5' GTAGCCAAATCCTTCTCTCCTGT 3'	61
РРІВ (зонд)		5' TGTTCCAAAACAGTGGATAATTTTGTGGCC 3'	62

Пример 2. Скрининг некодирующих молекул миРНК (табл. 1) в отношении ингибирования экспрессии мРНК LPA в клетках RT-4 человека.

Липосомальные трансфекционные комплексы готовили с тремя повторами в соотношении 1,5 мкл РНКиMax (ThermoFisher)/80 пмоль указанных молекул миРНК. Комплекс разбавляли до указанных концентраций 2,5 нМ и 25 нМ, соответственно (значения представлены попарно в виде светлых и более темных серых столбиков). Клетки переходноклеточной папилломы мочевого пузыря человека RT4, эндогенно экспрессирующие LPA, высевали при плотности 125000 клеток на лунку в 24-луночном формате поверх предварительно нанесенных трансфекционных комплексов (обратная трансфекция) в указанной концентрации. Через 24 ч после трансфекции общую РНК выделяли с применением набора Spin Cell Mini Kit 250 (Stratec). Уровни мРНК LPA определяли с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени относительно экспрессии мРНК РРІВ в соответствующих образцах в качестве транскрипта конститутивного гена. Значения нормировали к количеству мРНК LPA, обнаруженному в необработанных клетках (интрапланшет). Подавляющее соединение миРНК трансфицировали в качестве дополнительного контроля. Представлены средние значения и стандартные отклонения (SD) нормированных трехкратных значений. Результаты показаны на фиг. 1.

Пример 3. Дозозависимый ответ неконъюгированных LPA-нацеленных соединений миРНК на экспрессию мРНК LPA в клетках RT-4 человека.

Клетки переходноклеточной папилломы мочевого пузыря человека RT4 подвергали обратной трансфекции, как описано выше (пример 2), и обрабатывали в указанной концентрации (в диапазоне от 100 нМ до 0,2 нМ) с применением различных неконъюгированных соединений миРНК (табл. 1), как отмечено. Через 24 ч после трансфекции общую РНК выделяли с применением набора Spin Cell Mini Kit 250 (Strattec). Уровни мРНК LPA определяли с помощью кПЦР в режиме реального времени относительно экспрессии мРНК PPIB в соответствующих образцах в качестве транскрипта конститутивного гена. Значения нормировали к количеству мРНК LPA, обнаруженному в необработанных клетках. Столбики представляют остаточную экспрессию мРНК LPA для каждой точки данных. Результаты показаны на фиг. 2.

Пример 4. Ингибирование экспрессии мРНК LPA в первичных гепатоцитах человека и яванского макака под действием различных доз GalNAc-L1 LPA-1038-конъюгированной молекулы миРНК, доставленной путем опосредуемого рецепторами поглощения.

Первичные гепатоциты (ThermoFisher) высевали на покрытые коллагеном 96-луночные планшеты при плотности 45000 клеток на лунку (яванский макак) и 30000 клеток на лунку (человек). GalNAc-L1-конъюгированный LPA-1038 добавляли в указанных концентрациях (нМ) сразу после посева. Через 24 ч после обработки миРНК общую РНК выделяли с применением набора InviTrap RNA cell HTS (Strattec) для 96-луночного планшета. Уровни мРНК LPA определяли с помощью кПЦР в режиме реального времени относительно уровней мРНК актина (яванский макак) или APOB (человека) в соответствующих образцах в качестве транскрипта конститутивного гена. Значения нормировали к экспрессии LPA в необработанных клетках. Средние значения и стандартные отклонения нормированных трехкратных значений остаточных уровней мРНК LPA показаны в виде черных столбиков. Результаты показаны на фиг. 3.

Пример 5. Выключение мРНК LPA в первичных гепатоцитах человека под действием различных указанных L6-GalNAc-конъюгированных миРНК в первичных гепатоцитах человека после опосредуемой рецепторами доставки.

Первичные гепатоциты человека (ThermoFisher) высевали на покрытые коллагеном 96-луночные планшеты в количестве 30000 клеток на лунку (96-луночный формат). GalNAc-L6-конъюгированные миРНК, включая неподавляющий контроль, добавляли в двух указанных концентрациях сразу после посева клеток. Через 24 ч после обработки миРНК общую РНК выделяли с применением набора InviTrap RNA cell HTS (Strattec) для 96-луночного планшета. Уровни экспрессии мРНК LPA определяли с помощью кПЦР в режиме реального времени относительно мРНК APOB в качестве транскрипта конститутивного гена. Значения нормировали к экспрессии мРНК LPA в необработанных клетках, а остаточные уровни мРНК LPA представлены попарно в виде столбиков (100 нМ черные столбики, 20 нМ серые столбики). Средние значения и стандартные отклонения нормированных трехкратных значений показаны на фиг. 4.

Пример 6. Определение выключения TTR в условиях *in vitro* для различных GalNAc-конъюгатов миРНК TTR.

Первичные гепатоциты мыши высевали в предварительно покрытые коллагеном 96-луночные планшеты (Thermo Fisher Scientific, каталожный номер A1142803) при плотности клеток 30000 клеток на лунку и обрабатывали миРНК-конъюгатами в концентрациях, которые находятся в пределах диапазона от 10 нМ до 0,0001 нМ. Через 24 ч после обработки клетки лизировали и РНК экстрагировали с помощью препаративных наборов InviTrap® RNA Cell HTS 96/C24x96 (Strattec, каталожный номер 7061300400) в соответствии с протоколом производителя. Уровни транскриптов TTR и мРНК конститутивных генов (PtenII) определяли количественно с помощью анализа TaqMan.

Экспрессия гена-мишени в первичных гепатоцитах мыши через 24 ч после обработки конъюгатами согласно настоящему изобретению, конъюгатами 1-3, показала, что экспрессия гена-мишени снижается с увеличением дозы конъюгата по сравнению с отрицательными контролями (см. столбик "UT" и эталонный конъюгат 3), как показано на фиг. 7. Это свидетельствует о том, что первая цепь связывается с геном-мишенью, что снижает экспрессию гена. На фиг. 7 также показаны уровни экспрессии гена-мишени для эталонных конъюгатов 1 и 2, которые действуют как конъюгаты для сравнения. Как следует из сравнения данных, представленных на фиг. 7A и 7C, а также 7B и 7C, конъюгаты согласно настоящему изобретению (конъюгаты 1-3) снижают экспрессию гена-мишени по сравнению с эталонными конъюгатами 1 и 2. Наиболее эффективным конъюгатом при 0,01 нМ, по-видимому, является конъюгат 2. Наиболее эффективным конъюгатом при 0,1 нМ, 0,5 нМ, 1 нМ и 10 нМ, по-видимому, является конъюгат 3.

Пример 7. Временная динамика сывороточного TTR у мышей в условиях *in vivo*.

Мышей c57BL/6 обрабатывали с помощью подкожного введения 1 мг/кг миРНК-конъюгатов в 0 день. Образцы сыворотки отбирали на 7, 14 и 27 день путем сбора крови из орбитального синуса и хранили при -20°C до анализа. Количественное определение TTR в сыворотке выполняли с помощью ИФА для мышинного преальбумина (ALPCO, 41-PALMS/партия 22, 2008003B) в соответствии с протоколом производителя (разведение образца 1:8000 или 1:800).

Результаты для временной динамики сывороточного TTR в когортах мышей C57BL/6 с n=4 через 7, 14 и 27 дней после обработки с помощью подкожного введения 1 мг/кг конъюгатов 1-3, эталонных конъюгатов 1, 2 и 4 и у индивидуумов с имитированной обработкой (ФСБ) показаны на фиг. 8. Как свидетельствуют данные на фиг. 8, конъюгаты согласно настоящему изобретению особенно эффективны в уменьшении экспрессии гена-мишени по сравнению с отрицательным контролем (ФСБ) и эталонными конъюгатами 1, 2 и, в частности, эталонным конъюгатом 4. Конъюгаты 2 и 3 также более эффективны, чем эталонные конъюгаты 1, 2 и 4. Наиболее эффективным конъюгатом является конъюгат 2. Таким образом, можно ожидать, что уровень дозирования конъюгата 3 будет приблизительно в три раза ниже для достижения аналогичного начального выключения и также приведет к большей продолжительности выключения по сравнению с эталонным конъюгатом 4.

Более конкретно, у мышей дикого типа конъюгат 2 приводил к 3-кратному снижению уровня целевого белка в сыворотке на седьмой день и к 4-кратному снижению уровня целевого белка в сыворотке на 27 день по сравнению с эталонным конъюгатом 4 в эквивалентной дозе. Кроме того, конъюгат 2 привел к 85% уменьшению уровня целевого белка в сыворотке на 27 день после однократной инъекции по сравнению с 36% уменьшением при применении эквивалентного количества эталонного конъюгата 4.

Пример 8. Равное дозозависимое выключение для миРНК, нацеленной на LPA, с двумя отдельными элементами GalNAc, конъюгированными со второй цепью, по сравнению с трехантенным элементом GalNAc на 5' второй цепи в первичных гепатоцитах яванского макака.

МиРНК модифицированы с применением чередующихся 2'-ОМе/2'-F и каждая из них содержит две фосфотиоатные (PS) межнуклеотидные связи в своих двух 5' и 3'-концевых межнуклеотидных связях. В конъюгате 19 каждый элемент сериол-GalNAc присоединен за счет PS-связи к 5' и 3' второй цепи. В конъюгате 20 два концевых 5'-внутренних нуклеотида второй цепи представляют собой фосфодиэфиры, и трехантенный GalNAc-линкер присоединен за счет PS-связи к этому концу.

Дозозависимое выключение LPA в первичных гепатоцитах яванского макака оценивали через 24 ч после обработки 100, 20, 4, 0,8, 0,16, 0,032 и 0,006 нМ миРНК. Эталонный контроль представляет собой конструкцию 2, ненацеливающий контроль назван Ste. Ст-значение транскрипта для каждой группы обработки нормировали к значению ст транскрипта конститутивного гена ACTB (Act) и к необработанным гепатоцитам, названным ut (AAct).

Данные показаны на фиг. 10.

Материал и методы.

миРНК.

SEQ	Название	Серия	Цепь	Последовательность
ID NO:				
135	Конъюгат 19	X0373	X0373A	mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG
136			X0373B	Ser(GN) (ps) fC (ps) mG (ps) fG mU fA mA fU mG fG mA fC mA fG mA fG mU fU (ps) mA (ps) fU (ps) Ser(GN)
135	Эталонный конъюгат 9	STS20041L6	STS2041A	mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG
137			STS2041B	ST23 (ps) ST23 (ps) ST23 (ps) C6XLT (ps) fC mG fG mU fA mA fU mG fG mA fC mA fG mA fG mU fU (ps) mA (ps) fU
138	Эталонный конъюгат 5 (CTR)	X0125	X0125A	mC (ps) fU (ps) mU fA mC fU mC fU mC fG mC fC mC fA mA fG mC (ps) fG (ps) mA
139			X0125B	[(ST23) (ps)] <sub>3</sub> (C6XLT) (ps) fU mC fG mC fU mU fG mG fG mC fG mA fG mA fG mU fA (ps) mA (ps) fG

Подпись.

mA, mU, mC, mG	2'-О-метил РНК
fA, fU, fC, fG	2'-дезоксидезокси-2'-фтор-РНК
(ps)	фосфотиоат
(po)	фосфодиэфир

Праймер.

			SEQ ID NO:
Прямой	GTGTCCTCGCAACGTCCA		48
LPA Обратный	GACCCCGGGGCTTTG		49
Зонд	BHQ1-TGGCTGTTTCTGAACAAGCACCAATGG-FAM		140
Прямой	GCATGGGTCAGAAGGATTCCTAT		54
АСТВ Обратный	TGTAGAAGGTGTGGTGCCAGATT		55
Зонд	BHQ1-TCGAGCACGGCATCGTCACCAA-VIC		141

#### Общие методы

Эксперименты в условиях *in vitro*.

Первичные мышечные гепатоциты (Thermo Scientific: GIBCO партия № MC798) размораживали и заменяли среду для криоконсервации средой Williams E с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 1 мкМ дексаметазона, 2 мМ GlutaMax, 1% PenStrep, 4 мг/мл человеческого рекомбинантного инсулина, 15 мМ Нерес. Плотность клеток доводили до 250000 клеток на 1 мл. По 100 мкл на лунку этой клеточной суспензии высевали в предварительно покрытые коллагеном 96-луночные планшеты. Тестируемое изделие предварительно разводили в одной и той же среде (5-кратно концентрированной) для каждой концентрации, и 25 мкл этой предварительно разведенной миРНК или только среды добавляли к клеткам. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Через 24 ч после обработки супернатант удаляли, а клетки промывали в холодном ФБС и добавляли 250 мкл РНК-лизисного буфера S (Stratec). После 15 мин инкубации при комнатной температуре планшеты хранили при -80°C до выделения РНК в соответствии с протоколом производителя.

Анализ TaqMan.

Для анализа mTTR&PTEN Multiplex TaqMan по 10 мкл выделенной РНК для каждой группы обработки смешивали с 10 мкл общей реакционной смеси для ПЦР (TAKYON low Rox), содержащей 600 нМ праймера mTTR, 400 нМ праймера ApoB и 200 нМ каждого зонда, а также 0,5 единицы полимеразы Euroscript II RT с 0,2 ед. ингибитора РНКазы. Анализ TaqMan проводили в 384-луночной планшете с 10 мин RT-этапом при 48°C, 3 мин начальной денатурацией при 95°C и 40 циклами при 95°C в течение 10 с и 60°C в течение 1 минуты. Праймеры содержат два из BHQ1, FAM и YY, по одному на каждом конце последовательности.

Для анализа TMPRSS6&ApoB Multiplex TaqMan по 10 мкл выделенной РНК для каждой группы обработки смешивали с 10 мкл общей реакционной смеси для ПЦР (TAKYON low Rox), содержащей 800 нМ праймера TMPRSS6, 100 нМ праймера ApoB и 200 нМ каждого зонда, а также 0,5 единицы полимеразы Euroscript II RT с 0,2 ед. ингибитора РНКазы. Анализ TaqMan проводили в 384-луночной планшете с 10 мин RT-этапом при 48°C, 3 мин начальной денатурацией при 95°C и 40 циклами при 95°C в течение 10 с и 60°C в течение 1 мин.

Эксперименты в условиях *in vivo*.

Для сравнения эффективности в условиях *in vivo* различных конъюгатов миРНК 1 мг/кг миРНК, растворенной в ФБС, вводили подкожно в область лопатки мышей C57BL/6. Когорты с n=6 обрабатывали миРНК, нацеленной на Aldh2 или Tmprss6, в 1 день и умерщвляли в выбранные моменты времени после обработки. Образцы печени быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до экстракции РНК с помощью мини-набора Invitrap Spin Tissue RNA (Stratec) в соответствии с инструкцией производителя. После этого уровень транскриптов Aldh2, Tmprss6 и Pten определяли количественно, как описано выше.

Анализ стабильности в тритосомах.

Чтобы исследовать стабильность к РНКазе в эндосомальном/лизосомальном компартменте печеночных клеток в условиях *in vitro*, миРНК инкубировали в течение 0 ч, 4 ч, 24 ч или 72 ч в тритосомах печени крыс Sprague Dawley (Tebu-Bio, каталожный номер R0610.LT, партия: 1610405, pH: 7,4, 2,827 единиц/мл). Для имитации закисленной среды тритосома смешивали в соотношении 1:10 с буфером с низким pH (1,5 М уксусная кислота, 1,5 М ацетат натрия, pH=4,75). 30 мкл подкисленных тритосом. Затем 10 мкл миРНК (20 мкМ) смешивали и инкубировали в течение указанных моментов времени при 37°C. После инкубации РНК выделяли с помощью картриджей для стартового набора Clarity OTX

(Phenomenex, каталожный номер KSO-8494) в соответствии с протоколом производителя для биологических жидкостей. Лиофилизированную РНК восстанавливали в 30 мкл H<sub>2</sub>O, смешивали с 4-кратным буфером для загрузки и 5 мкл загружали в 20% ТВЕ-полиакриламидный гель для электрофореза (PAGE) для разделения в качественном полуколичественном анализе. PAGE проводили при 120 В в течение 2 ч, и РНК визуализировали с помощью окрашивания бромидом этидия с последующей цифровой визуализацией с применением системы визуализации Biorad.

Пример 9. Синтез конъюгатов.

Примерные соединения синтезировали в соответствии со способами, описанными ниже, и способами, известными специалисту в данной области техники. Сборку олигонуклеотидной цепи и линкерных строительных элементов выполняли с помощью твердофазного синтеза с применением фосфоамидитной методологии. Конъюгацию GalNAc осуществляли путем образования пептидной связи между строительным элементом GalNAc-карбоновая кислота и предварительно собранным и очищенным олигонуклеотидом, содержащим необходимое количество присоединенных аминокислотных модифицированных линкерных строительных элементов.

Синтез, удаление защитных групп и очистку олигонуклеотидов проводили в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области техники.

Все олигонуклеотиды синтезировали на синтезаторе АКТА oligopilot с применением стандартных фосфоамидитных реакций. Применяли коммерчески доступную твердую подложку и 2'-О-метил-РНК-фосфоамидиты, 2'-фтор, 2'-дезоксирНК-фосфоамидиты (все со стандартной защитой, ChemGenes, Link-Tech) и коммерчески доступный 3'-амино-модификатор TFA-амино-С-6-Icaa-CPG 500 Å (Chemgenes), Fmoc-амино-DMT-С-7-CE-фосфоамидит (GlyC3Am), 3'-амино-модификатор С-3-Icaa-CPG 500 Å (C3Am), Fmoc-амино-DMT-С-3-CED-фосфоамидит (C3Am) и TFA-амино-С-6-CED-фосфоамидит (C6Am) (Chemgenes), 3'-амино-модификатор С7 CPG (C7Am) (Glen Research), нуклеозидный TFA-аминофосфоамидит (Pip), нуклеозидную TFA-амино-твердую подложку (PipAm) (AM Chemicals). Пер-ацетилованный галактозамин 8 доступен коммерчески.

Вспомогательные реагенты приобретали у EMP Biotech. Синтез выполняли с применением 0,1 М раствора фосфоамидита в сухом ацетонитриле, и в качестве активатора применяли бензилтиотетразол (БТТ) (0,3 М в ацетонитриле). Время связывания составляло 15 мин. Применяли цикл Cap/OX/Cap или Cap/Thio/Cap (Cap: Ac<sub>2</sub>O/NMI/лутидин/ацетонитрил, окислитель: 0,1 М I<sub>2</sub> в пиридине/H<sub>2</sub>O). Фосфотиоаты вводили с применением стандартного коммерчески доступного реагента для тиолирования (EDITH, Link technologies). Отщепление DMT осуществляли с помощью обработки 3% дихлоруксусной кислотой в толуоле. После завершения запрограммированных циклов синтеза выполняли промывку диэтиламино (DEA). Все олигонуклеотиды синтезировали в режиме DMT-off.

Присоединение линкерной группы, происходящей из серинола, осуществляли с применением либо (S)-DMT-серинол(TFA)-сукцинат-Icaa-CPG 10, загруженного основанием, либо (S)-DMT-серинол(TFA)фосфоамидита 7 (синтез выполняли, как описано в Hoevelmann et al. (2016)). Трехантенные кластеры GalNAc (ST23/C4XLT) вводили путем последовательного связывания соответствующих уротильных амидитных производных (C4XLT-phos) с последующим добавлением амидита GalNAc (ST23-phos).

Присоединение аминокислотных модифицированных групп (линкеров, происходящих не из серинола) осуществляли путем применения либо соответствующего коммерчески доступного аминокислотного модифицированного строительного элемента CPG, либо амидита.

Одиночные цепи отщепляли от CPG с помощью обработки 40% водн. метиламином. Полученный неочищенный олигонуклеотид очищали с помощью ионообменной хроматографии (Resource Q, 6 мл, GE Healthcare) на системе для ВЭЖХ АКТА Pure с применением градиента хлорида натрия. Содержащие продукт фракции объединяли, обессоливали на колонке для гель-проникающей хроматографии (Zetadex, EMP Biotech) и лиофилизировали.

Отдельные одиночные цепи растворяли в концентрации 60 OD/мл в H<sub>2</sub>O. Оба раствора отдельных олигонуклеотидов добавляли вместе в реакционный сосуд. Для облегчения мониторинга реакции выполняли титрование. Первую цепь добавляли с 25% избытком по сравнению со второй цепью, что определяли по УФ-поглощению при 260 нм. Реакционную смесь нагревали до 80°C в течение 5 мин и затем медленно охлаждали до комнатной температуры. Образование двойной цепи контролировали по образованию ионных пар методом ВЭЖХ с обращенной фазой. На основании УФ-площади остаточной одиночной цепи рассчитывали необходимое количество второй цепи и добавляли его к реакционной смеси. Реакционную смесь снова нагревали до 80°C и медленно охлаждали до комнатной температуры. Эту процедуру повторяли до тех пор, пока не было обнаружено менее 10% остаточной одиночной цепи.

Синтез соединений 2-10.

Соединения 2-5 и (S)-DMT-серинол(TFA)-фосфоамидит 7 синтезировали в соответствии с опубликованными в литературе способами (Hoevelmann et al. Chem. Sci., 2016,7, 128-135).

(S)-4-(3-(бис-(4-Метоксифенил)(фенил)метокси)-2-(2,2,2-трифторацетиламино)пропокси)-4-оксобутановая кислота (6).

К раствору 5 в пиридине добавляли сукциновый ангидрид, а затем DMAP. Полученную смесь пе-

ремешивали при комнатной температуре в течение ночи. Весь исходный материал был израсходован согласно оценке методом ТСХ. Реакцию концентрировали. Неочищенный материал подвергали хроматографии на силикагеле, используя градиент от 0 до 5% метанола в ДХМ (+1% триэтиламина), с получением 1,33 г 6 (выход=38%).  $m/z$  (ESI): 588,2 (100%), (рассчитано для  $C_{30}H_{29}F_3NO_8$  [M-H]<sup>-</sup> 588,6), <sup>1</sup>H-ЯМР: (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  [ppm]=7,94 (d, 1H, NH), 7,39-7,36 (m, 2H, СНарил), 7,29-7,25 (m, 7H, СНарил), 6,82-6,79 (m, 4H, СНарил), 4,51-4,47 (m, 1H), 4,31-4,24 (m, 2H), 3,77 (s, 6H, 2xDMTr-OMe), 3,66-3,60 (m, 16H, HNEt<sub>3</sub><sup>+</sup>), 3,26-3,25 (m, 2H), 2,97-2,81 (m, 20H, NEt<sub>3</sub>), 2,50-2,41 (4H, m), 1,48-1,45 (m, 26H, HNEt<sub>3</sub><sup>+</sup>), 1,24-1,18 (m, 29H, NEt<sub>3</sub>).

(S)-DMT-Серинол(ТФА)-сукцинат-Icaa-CPG (10).

(S)-DMT-Серинол(ТФА)-сукцинат (159 мг, 270 мкмоль) и НВТУ (113 мг, 299 мкмоль) растворяли в СН<sub>3</sub>CN (10 мл). К раствору добавляли диизопропилэтиламин (DIPEA, 94 мкл, 540 мкмоль) и смесь перемешивали в течение 2 минут с последующим добавлением нативного аминокислоты-Icaa-CPG (500 А, 3 г, содержание амина: 136 мкмоль/г). Суспензию осторожно встряхивали при комнатной температуре на шейкере, имитирующем движение запястья, в течение 16 ч, затем фильтровали и промывали ДХМ и EtOH. Твердую подложку высушивали в вакууме в течение 2 ч. Не вступившие в реакцию амины на носителе эапирировали с помощью перемешивания с уксусным ангидридом/лутидином/N-метилимидазолом при комнатной температуре. Промывку подложки повторяли, как описано выше. Твердое вещество высушивали в вакууме с получением твердой подложки 10 (3 г, загрузка 26 мкмоль/г).

GalNAc синтон (9).

Синтез GalNAc синтона 9 выполняли, как описано в Nair et al. J. Am. Chem. Soc, 2014, 136 (49), pp. 16958-16961, с 46% выходом в течение двух этапов.

Характеристические данные соответствуют опубликованным данным.

Синтез олигонуклеотидов.

Все одноцепочечные олигонуклеотиды синтезировали в соответствии с условиями реакции, описанными выше и на фиг. 5 и 6, и представили в табл. 3 и 4.

Все готовые одноцепочечные продукты анализировали с помощью АХ-ВЭЖХ для подтверждения их чистоты. Чистота представлена в % FLP (% полноразмерного продукта), который представляет собой процент УФ-площади под сигналом заданного продукта на УФ-кривой анализа готового продукта методом АХ-ВЭЖХ. Идентичность соответствующих одноцепочечных продуктов (немодифицированных, аминокислотомодифицированных предшественников или GalNAc-конъюгированных олигонуклеотидов) подтверждали с помощью анализа методом ЖХ/МС.

Таблица 3

Одноцепочечные неконъюгированные олигонуклеотиды				
Продукт (11)	Название	Рассчитанная	Установленная	%FLP (АХ- ВЭЖХ)
		мол. масса	мол. масса (ESI-)	
A0002	STS16001A	6943,3 Да	6943,0 Да	86,6%
A0006	STS16001BL4	8387,5 Да	8387,5 Да	94,1%
A0114	STS22006A	6143,8 Да	6143,7 Да	94,3%
A0115	STS22006BL1	7855,1 Да	7855,1 Да	92,8%
A0122	STS22009A	6260,9 Да	6260,6 Да	92,8%
A0123	STS22009BL1	7783,0 Да	7782,9 Да	87,1%
A0130	STS18001A	6259,9 Да	6259,8 Да	76,5%
A0131	STS18001BL4	7813,2 Да	7813,1 Да	74,3%
A0220	STS16001B-5'1xNH2	6982,2 Да	6982,1 Да	95,7%
A0237	STS16001A	6943,3 Да	6943,3 Да	95,6%
A0244	STS16001BV1	6845,2 Да	6844,9 Да	98,2%
A0264	STS16001AV4-3'1xNH2	7112,4 Да	7112,2 Да	95,4%
A0329	STS16001BV6-3'5'1xNH2	7183,3 Да	7183,2 Да	88,8%
A0560	STS16001A	6943,3 Да	6943,3 Да	96,7%
A0541	STS16001BV1-3'5'NH2	7151,3 Да	7151,0 Да	85,6%
A0547	STS16001BV16-3'5'NH2	7119,3 Да	7119,1 Да	89,9%
A0617	STS16001BV20-3'5'NH2	7087,3 Да	7086,7 Да	90,1%
A0619	STS16001BV1-3'5'2xNH2	7521,3 Да	7521,3 Да	93,4%
A0680	STS16001A	6943,3 Да	6942,9 Да	91,2%



A0514	STS22006A	6143,8 Да	6143,7 Да	94,6%
A0516	STS22009BV11-3'5'NH <sub>2</sub>	6665,0 Да	6664,8 Да	87,0%
A0517	STS22009BV11-3'5'NH <sub>2</sub>	6593,0 Да	6593,0 Да	86,0%
A0521	STS12009BV1-3'5'NH <sub>2</sub>	6437,7 Да	6437,8 Да	91,1%
A0303	STS12209BL4	7665,0 Да	7664,9 Да	90,4%
A0304	STS12209A	6393,1 Да	6392,9 Да	77,6%
A0319	STS22009A	6260,9 Да	6260,5 Да	86,9%
A0353	STS12009A	6416,1 Да	6416,1 Да	94,1%
A0216	STS17001A	6178,8 Да	6178,7 Да	87,2%
A0217	STS17001BL6	7937,2 Да	7937,2 Да	78,3%

5'1×NH<sub>2</sub> означает положение (5'-конец) и количество (1×NH<sub>2</sub>) свободных аминогрупп, происходящих из серинола, которые доступны для конъюгации. Например, 1×3'NH<sub>2</sub> на A0264 означает, что имеется свободная аминогруппа, которая может реагировать с GalNAc синтоном 9 на 3'-конце цепи A0264. 3'5'1×NH<sub>2</sub> означает, что имеется одна свободная аминогруппа, происходящая из серинола, которая может реагировать с GalNAc линкером 9 на 3'-конце и 5'-конце цепи.

Таблица 4

Одноцепочечные олигонуклеотиды с 5' и 3' модификациями						
Продукт	Название	5'-модиф.	3'-модиф.	Рассчитанная мол. масса	Установленная мол. масса	%FLP (AX- ВЭЖХ)
A0561	STS16001BV1- 3'5'1×NH <sub>2</sub>	C6Am	GlyC3Am	7267,5 Да	7267,5 Да	66,7%
A0563	STS16001BV1- 3'5'1×NH <sub>2</sub>	C3Am	C3Am	7183,4 Да	7183,1 Да	75,1%
A0651	STS16001BV1- 3'5'1×NH <sub>2</sub>	C6Am	C7Am	7265,6 Да	7265,2 Да	99,6%
A0653	STS16001BV1- 3'5'1×NH <sub>2</sub>	GlyC3Am	GlyC3Am	7299,5 Да	7299,3 Да	88,1%
A0655	STS16001BV1- 3'5'1×NH <sub>2</sub>	PipAm	PipAm	7517,7 Да	7517,5 Да	89,8%

Аналогичным образом, 3'5'1×NH<sub>2</sub> относится к положению (3' и 5'-конец) и количеству (1×NH<sub>2</sub> каждая) свободных аминогрупп, которые доступны для конъюгации. Например, 3'5'1×NH<sub>2</sub> на A0561 означает наличие 2 свободных аминогрупп (1 на 3'-конце и 1 на 5'-конце), которые могут реагировать с GalNAc синтоном 9 на 3'-конце цепи A0561.

Синтез некоторых конъюгатов и эталонных конъюгатов 1-2.

Конъюгацию GalNAc синтона (9) осуществляли путем связывания с функциональной аминогруппой серинола соответствующей олигонуклеотидной цепи 11 с применением связывающего реагента для образования пептидной связи. Таким образом, соответствующую амино-модифицированную молекулу-предшественника 11 растворяли в H<sub>2</sub>O (500 OD/мл) и добавляли ДМСО (ДМСО/H<sub>2</sub>O, 2/1, об./об.), а затем DIPEA (2,5% от общего объема). В отдельном реакционном сосуде выполняли предварительную активацию GalN(Ас4)-С4-кислоты (9) с помощью взаимодействия 2 экв. (на функциональную аминогруппу в амино-модифицированном предшественнике олигонуклеотида 11) компонента карбоновой кислоты с 2 экв. НВТУ в присутствии 8 экв. DIPEA в ДМСО. Через 2 мин предварительно активированное соединение 9 добавляли к раствору соответствующей амино-модифицированной молекулы-предшественника. Через 30 мин ход реакции контролировали с помощью ЖХ/МС или АХ-ВЭЖХ. После завершения реакции конъюгирования неочищенный продукт осаждали добавлением 10×iPrOH и 0,1×2 М NaCl и собирали с помощью центрифугирования и декантации. Чтобы высвободить ацелированные гидроксильные группы в группах GalNAc, полученный осадок растворяли в 40% MeNH<sub>2</sub> (1 мл на 500 OD) и через 15 мин при комнатной температуре разбавляли в H<sub>2</sub>O (1:10), а в завершение повторно очищали с помощью анионного обмена и гель-проникающей хроматографии и лиофилизировали с получением готового продукта 12 (табл. 5).

Таблица 5

Одноцепочечные GalNAc-конъюгированные олигонуклеотиды					
Продукт (12)	Исходный материал	Название	Рассчитанная мол. масса	Установленная мол. масса (ESI-)	%FLP (АХ- ВЭЖХ)
A0241	A0220	STS16001BL20	7285,5 Да	7285,3 Да	91,8%
A0268	A0264	STS16001AV4L33	7415,7 Да	7415,4 Да	96,9%
A0330	A0329	STS16001BV6L42	7789,8 Да	7789,8 Да	95,5%
A0544	A0541	STS16001BV1L75	7757,9 Да	7757,7 Да	93,3%
A0550	A0547	STS16001BV16L42	7725,9 Да	7725,7 Да	88,5%
A0620	A0617	STS16001BV20L75	7693,91 Да	7693,2 Да	90,9%
A0622	A0619	STS16001BV1L94	8734,3 Да	8734,6 Да	82,9%
A0519	A0516	STS22006BV11L42	7271,7 Да	7271,7 Да	90,0%
A0520	A0517	STS22009BV11L42	7199,6 Да	7199,7 Да	92,9%
A0522	A0521	STS12009BV1L42	7044,4 Да	7044,4 Да	96,0%
A0603	A0602	STS20041BV1L42	7280,7 Да	7280,4 Да	93,4%

Синтез некоторых конъюгатов согласно настоящему изобретению.

Конъюгацию GalNAc синтона (9) осуществляли путем связывания с функциональной аминогруппой соответствующей олигонуклеотидной цепи 14 с применением связывающего реагента для образования пептидной связи. Таким образом, соответствующую amino-модифицированную молекулу-предшественника 14 растворяли в H<sub>2</sub>O (500 OD/мл) и добавляли ДМСО (ДМСО/H<sub>2</sub>O, 2/1, об./об.), а затем DIPEA (2,5% от общего объема). В отдельном реакционном сосуде выполняли предварительную активацию GalN(Ac<sub>4</sub>)-C<sub>4</sub>-кислоты (9) с помощью взаимодействия 2 экв. (на функциональную аминогруппу в amino-модифицированном предшественнике олигонуклеотида 14) компонента карбоновой кислоты с 2 экв. NBTU в присутствии 8 экв. DIPEA в ДМСО. Через 2 мин предварительно активированное соединение 9 добавляли к раствору соответствующей amino-модифицированной молекулы-предшественника. Через 30 мин ход реакции контролировали с помощью ЖХ/МС или АХ-ВЭЖХ. После завершения реакции конъюгирования неочищенный продукт осаждали добавлением 10×iPrOH и 0,1×2 М NaCl и собирали с помощью центрифугирования и декантации. Чтобы высвободить ацетилированные гидроксильные группы в группах GalNAc, полученный осадок растворяли в 40% MeNH<sub>2</sub> (1 мл на 500 OD) и через 15 мин при комнатной температуре разбавляли в H<sub>2</sub>O (1:10), а в завершение повторно очищали с помощью анионного обмена и гель-проникающей хроматографии и лиофилизировали с получением готового продукта 15 (табл. 6).

Таблица 6

Одноцепочечные GalNAc-конъюгированные олигонуклеотиды					
Продукт (15)	Исходный материал	Название	Рассчитанная мол. масса	Установленная мол. масса (ESI-)	%FLP (АХ- ВЭЖХ)
A0562	A0561	STS16001BV1L87	7874,2 Да	7874,0 Да	82,7%
A0564	A0563	STS16001BV1L88	7790,0 Да	7789,4 Да	90,4%
A0652	A0651	STS16001BV1L96	7872,2 Да	7871,8 Да	94,6%
A0654	A0653	STS16001BV1L97	7906,2 Да	7905,6 Да	89,9%
A0656	A0655	STS16001BV1L98	8124,3 Да	8124,0 Да	93,6%

Образование двойной цепи.

Двойные цепи получали в соответствии со способами, описанными выше.

Чистота двойной цепи представлена в % двойной цепи, который представляет собой процент УФ-площади под сигналом заданного продукта на УФ-кривой анализа методом ИП-ОФ-ВЭЖХ (табл. 7).

Таблица 7

Конъюгаты нуклеиновых кислот				
Продукт	Исходные материалы		Название	% двойная цепь
	Первая цепь	Вторая цепь		
Эталонный конъюгат 1	A0237	A0241	STS16001L20	97,7%
Эталонный конъюгат 2	A0268	A0244	STS16001L33	97,8%
Эталонный конъюгат 3	A0130	A0131	STS18001L4	96,8%
Эталонный конъюгат 4	A0002	A0006	STS16001L4	90,1%
Эталонный конъюгат 5	A0216	A0217	STS17001L6	88,4%
Конъюгат 1	A0268	A0241	STS16001L24	96,0%
Конъюгат 2	A0237	A0330	STS16001V1L42	98,5%
Конъюгат 3	A0268	A0330	STS16001V1L43	98,2%
Конъюгат 4	A0560	A0544	STS16001V1L75	92,5%
Конъюгат 5	A0560	A0550	STS16001V16L42	95,3%
Конъюгат 6	A0237	A0620	STS16001V20L75	97,8%
Конъюгат 7	A0237	A0622	STS16001V1L94	93,7%
Конъюгат 8	A0680	A0652	STS16001V1L96	98,4%
Конъюгат 9	A0680	A0654	STS16001V1L97	95,8%
Конъюгат 10	A0680	A0656	STS16001V1L98	97,6%
Конъюгат 11	A0560	A0564	STS16001V1L88	95,0%
Конъюгат 12	A0237	A0562	STS16001V1L87	96,8%
Конъюгат 13	A0114	A0115	STS22006L1	85,6%
Конъюгат 14	A0122	A0123	STS22009L1	96,4%
Конъюгат 15	A0514	A0519	STS22006V11L42	98,6%
Конъюгат 16	A0319	A0520	STS22009V11L42	97,0%
Конъюгат 17	A0304	A0303	STS12209L4	93,0%
Конъюгат 18	A0353	A0522	STS12009V1L42	98,0%
Конъюгат 19	A0601	A0603	STS20041BL42	97,6%

#### Последовательности

Обозначения модификаций для следующих последовательностей:

f обозначает 2'-фтор-2'-дезоксирибонуклеотид или 2'-фторрибонуклеотид (термины являются взаимозаменяемыми);

m обозначает 2'-О-метилрибонуклеотид;

(ps) обозначает фосфотиоатную связь;

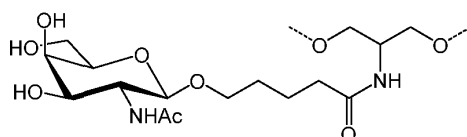
FAM=6-карбоксихлорофлуоресцеин;

BHQ=тушитель "Черная дыра" 1;

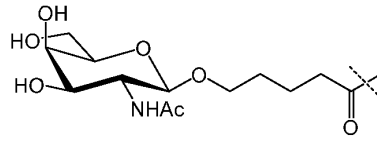
YY=Yakima Yellow.

#### Определения

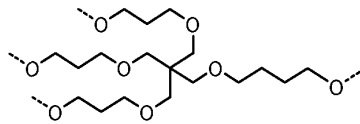
Ser(GN) представляет собой строительный элемент GalNAc-C4, присоединенный к линкерной группе, происходящей из серинола:



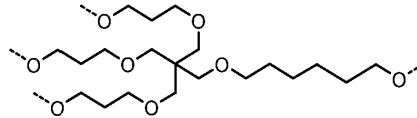
где O--- представляет собой связь между атомом кислорода и, например, H, фосфодиэфирную связь или фосфотиоатную связь. GN представляет собой:



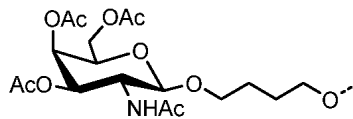
C4XLT представляет собой:



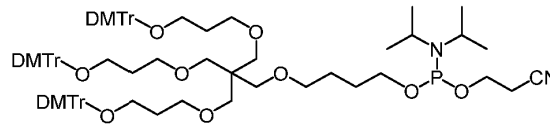
C6XLT представляет собой:



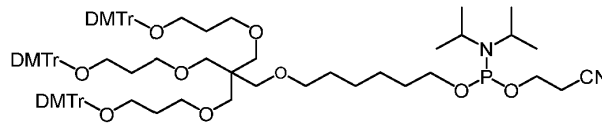
ST23 представляет собой:



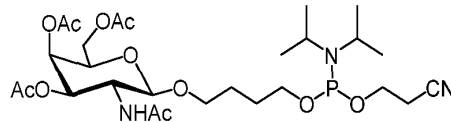
Синтез фосфоамидитных производных C4XLT (C4XLT-phos), C6XLT (C6XLT-phos), а также ST23 (ST23-phos) можно выполнять, как описано в WO 2017/174657. C4XLT-phos:



C6XLT-phos:



ST23-phos:



<p>C3Am представляет собой:</p>	<p>lrb представляет собой:</p>	<p>GlyC3Am представляет собой:</p>
<p>C6Am представляет собой:</p>	<p>Pip Am представляет собой:</p>	<p>C7Am представляет собой:</p>

где G=H (до конъюгации) или G=GN (после конъюгации).

## Конъюгат 1

Антисмысловая цепь—STS16001AL33 (SEQ ID NO: 127)

5' mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps)  
fU (ps) mU (ps) Ser(GN) 3'

Смысловая цепь—STS16001BL20 (SEQ ID NO: 128)

5' Ser(GN) (ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU  
(ps) mA (ps) fA 3'

## Конъюгат 2

Антисмысловая цепь—STS16001A (SEQ ID NO: 129)

mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU  
(ps) mU

Смысловая цепь—STS16001BVIL42 (SEQ ID NO: 130)

Ser(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU  
mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) Ser(GN)

## Конъюгат 3

Антисмысловая цепь—STS16001AL33 (SEQ ID NO: 127)

5' mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps)  
fU (ps) mU (ps) Ser(GN) 3'

Смысловая цепь—STS16001BVIL42 (SEQ ID NO: 130)

5' Ser(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU  
mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) Ser(GN) 3'

## Конъюгат 4

Антисмысловая цепь—STS16001A (SEQ ID NO: 129)

mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU  
(ps) mU

Смысловая цепь—STS16001BVIL75 (SEQ ID NO: 142)

5' Ser(GN) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA  
fU (ps) mA (ps) fA Ser(GN) 3'

## Конъюгат 5

Антисмысловая цепь—STS16001A (SEQ ID NO: 129)

mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU  
(ps) mU

Смысловая цепь—STS16001BV16L42 (SEQ ID NO: 143)

5' Ser(GN) (ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU  
mA fA (ps) Ser(GN) 3'

## Конъюгат 6

Антисмысловая цепь—STS16001A (SEQ ID NO: 129)

mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU  
(ps) mU

Смысловая цепь—STS16001BV20L75 (SEQ ID NO: 144)

5' Ser(GN) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU mA  
fA Ser(GN) 3'

## Конъюгат 7

Антисмысловая цепь—(SEQ ID NO: 129)

mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU  
(ps) mU

Смысловая цепь—STS16001BV1L94 (SEQ ID NO: 145)

5' Ser(GN) (ps) Ser(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG  
mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) Ser(GN) (ps) Ser(GN) 3'

Конъюгат 8

Антисмысловая цепь–STS16001A (SEQ ID NO: 129)

5' mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps)  
fU (ps) mU 3'

Смысловая цепь–STS16001V1BL96 (SEQ ID NO: 146)

5' C6Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC  
fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) C7Am(GN) 3'

Конъюгат 9

Антисмысловая цепь–STS16001A (SEQ ID NO: 129)

5' mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps)  
fU (ps) mU 3'

Смысловая цепь–STS16001V1BL97 (SEQ ID NO: 147)

5' GlyC3Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU  
mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) GlyC3Am(GN) 3'

Конъюгат 10

Антисмысловая цепь–STS16001A (SEQ ID NO: 129)

5' mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps)  
fU (ps) mU 3'

Смысловая цепь (SEQ ID NO: 148)

5' PipAm(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC  
fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) PipAm(GN) 3'

Конъюгат 11

Антисмысловая цепь–STS16001A (SEQ ID NO: 129)

5' mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps)  
fU (ps) mU 3'

Смысловая цепь–STS16001V1BL88 (SEQ ID NO: 149)

5' C3Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC  
fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) C3Am(GN) 3'

Конъюгат 12

Антисмысловая цепь–STS16001A (SEQ ID NO: 129)

5' mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps)  
fU (ps) mU 3'

Смысловая цепь—STS16001V1BL87 (SEQ ID NO: 150)

5' C6Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC  
fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) GlyC3Am(GN) 3'

Конъюгат 15

Антисмысловая цепь (SEQ ID NO: 151)

mU (ps) fC (ps) mU fU mC fU mU fA mA fA mC fU mG fA mG fU mU (ps) fU (ps)  
mC

Смысловая цепь (SEQ ID NO: 152)

Ser(GN) (ps) fG (ps) mA (ps) fA mA fC mU fC mA fG mU fU mU fA mA fG mA fA  
(ps) mG (ps) fA (ps) Ser(GN)

Конъюгат 16

Антисмысловая цепь (SEQ ID NO: 153)

mA (ps) fU (ps) mG fU mA fG mC fC mG fA mG fG mA fU mC fU mU (ps) fC (ps)  
mU

Смысловая цепь (SEQ ID NO: 154)

Ser(GN) (ps) fA (ps) mG (ps) fA mA fG mA fU mC fC mU fC mG fG mC fU mA fC  
(ps) mA (ps) fU (ps) Ser(GN)

Конъюгат 18

Антисмысловая цепь (SEQ ID NO: 155)

mA (ps) fA (ps) mC fC mA fG mA fA mG fA mA fG mC fA mG fG mU (ps) fG (ps)  
mA

Смысловая цепь (SEQ ID NO: 156)

Ser(GN) (ps) fU (ps) mC (ps) fA mC fC mU fG mC fU mU fC mU fU mC fU mG fG  
(ps) mU (ps) fU (ps) Ser(GN)

Конъюгат 19

Антисмысловая цепь (SEQ ID NO: 135)

mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG

Смысловая цепь (SEQ ID NO: 136)

Ser(GN) (ps) fC (ps) mG (ps) fG mU fA mA fU mG fG mA fC mA fG mA fG mU fU  
(ps) mA (ps) fU (ps) Ser(GN)

Эталонный конъюгат 1

Антисмысловая цепь—STS16001A (SEQ ID NO: 129)

mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU  
(ps) mU

Смысловая цепь—STS16001BL20 (SEQ ID NO: 128)

Ser(GN) (ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps)  
mA (ps) fA

Эталонный конъюгат 2

Антисмысловая цепь–STS16001AL33 (SEQ ID NO: 127)

mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU  
(ps) mU (ps) Ser(GN)

Смысловая цепь–STS16001BV1 (SEQ ID NO: 157)

fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA  
(ps) fA

Эталонный конъюгат 3 – “Luc”

Антисмысловая цепь–STS18001A (A0130, SEQ ID NO: 132)

mU (ps) fC (ps) mG fA mA fG mU fA mU fU mC fC mG fC mG fU mA (ps) fC (ps) mG

Смысловая цепь–STS18001BL4 (A0131, SEQ ID NO: 133)

[(ST23) (ps)]<sub>3</sub> C4XLT (ps) fC mG fU mA fC mG fC mG fG mA fA mU fA mC fU mU  
fC (ps) mG (ps) fA

Эталонный конъюгат 4

Антисмысловая цепь–STS16001AL33 (SEQ ID NO: 127)

mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU  
(ps) mU

Смысловая цепь–STS16001BL4 (SEQ ID NO: 134)

5'[(ST23) (ps)]<sub>3</sub> C4XLT(ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG  
mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA

Эталонный конъюгат 5 – “Ctr”

Антисмысловая цепь (SEQ ID NO: 138)

mC (ps) fU (ps) mU fA mC fU mC fU mC fG mC fC mC fA mA fG mC (ps) fG (ps) mA

Смысловая цепь (SEQ ID NO: 139)

[(ST23) (ps)]<sub>3</sub> (C6XLT) (ps) fU mC fG mC fU mU fG mG fG mC fG mA fG mA fG mU  
fA (ps) mA (ps) fG

Эталонный конъюгат 6

Антисмысловая цепь (SEQ ID NO: 151)

mU (ps) fC (ps) mU fU mC fU mU fA mA fA mC fU mG fA mG fU mU (ps) fU (ps)  
mC

Смысловая цепь (SEQ ID NO: 158)

[ST23 (ps)]<sub>3</sub> ltrb (ps) fG mA fA mA fC mU fC mA fG mU fU mU fA mA fG mA fA  
(ps) mG (ps) fA



Эталонный конъюгат 7

Антисмысловая цепь (SEQ ID NO: 153)

mA (ps) fU (ps) mG fU mA fG mC fC mG fA mG fG mA fU mC fU mU (ps) fC (ps)

mU

Смысловая цепь (SEQ ID NO: 159)

[ST23 (ps)]3 ltrb (ps) fA mG fA mA fG mA fU mC fC mU fC mG fG mC fU mA fC (ps)

mA (ps) fU

Эталонный конъюгат 8

Антисмысловая цепь (SEQ ID NO: 160)

mU (ps) fA (ps) mC fC mA fG mA fA mG fA mA fG mC fA mG fG mU (ps) fG (ps)

mA

Смысловая цепь (SEQ ID NO: 161)

[ST23 (ps)]3 ST41 (ps) fU mC fA mC fC mU fG mC fU mU fC mU fU mC fU mG fG

(ps) mU (ps) fA

Эталонный конъюгат 9

Антисмысловая цепь (SEQ ID NO: 135)

mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG

Смысловая цепь (SEQ ID NO: 162)

[ST23 (ps)]3 C6XLT (ps) fC mG fG mU fA mA fU mG fG mA fC mA fG mA fG mU fU

(ps) mA (ps) fU

Пример 10. Определение выключения TTR в условиях *in vitro* для различных GalNAc-конъюгатов миРНК TTR.

Конъюгаты 4-7.

Применяли способ, описанный выше под заголовком "Эксперименты в условиях *in vitro*" в разделе "Общие методы".

Экспрессия гена-мишени в первичных мышинных гепатоцитах через 24 ч после обработки 0,01 нМ, 0,1 нМ, 0,5 нМ, 1 нМ и 10 нМ конъюгатов согласно настоящему изобретению, конъюгатов 4-7, показала, что экспрессия гена-мишени снижается с увеличением дозы конъюгата по сравнению с отрицательными контролями (см. столбик "UT" и Luc [эталонный конъюгат 3]), как показано на фиг. 11. Это свидетельствует о том, что первая цепь связывается с геном-мишенью, снижая экспрессию гена.

Данные, полученные в условиях *in vitro*, показывают, что в случае одной или двух линкерных групп, происходящих из серинола, обеспеченных на 5' и 3'-концах смысловой цепи в конъюгатах 4-7, количество фосфотиоатных (PS) связей между концевым нуклеотидом и линкером, и/или между тремя концевыми нуклеотидами в смысловой цепи можно изменять, сохраняя эффективность снижения экспрессии гена-мишени.

Конъюгаты 8-12 и 19.

Применяли способ, описанный выше под заголовком "Эксперименты в условиях *in vitro*" в разделе "Общие методы".

Экспрессия гена-мишени в первичных мышинных гепатоцитах через 24 ч после обработки 0,01 нМ, 0,1 нМ, 0,5 нМ, 1 нМ и 10 нМ конъюгатов согласно настоящему изобретению, конъюгатов 8-12, показала, что экспрессия гена-мишени снижается с увеличением дозы конъюгата по сравнению с отрицательными контролями (см. столбик "UT" и Luc [эталонный конъюгат 3]), как показано на фиг. 12. Это свидетельствует о том, что первая цепь связывается с геном-мишенью, что снижает экспрессию гена. В частности, конъюгаты 8, 9, 10 и 11, по-видимому, сопоставимы с конъюгатом 2 или превосходят его, который, как показано ранее, был наиболее эффективным конъюгатом при 0,01 нМ.

Также было показано, что конъюгат 19 снижает экспрессию гена-мишени по сравнению с отрицательными контролями (см. столбик "UT" и Str, который представляет собой ненацеливающую миРНК и также называется эталонным конъюгатом 5), как показано на фиг. 13. Это свидетельствует о том, что первая цепь связывается с геном-мишенью, что снижает экспрессию гена.

Данные, полученные в условиях *in vitro*, для конъюгатов 8-12 и 19, показывают, что ряд линкеров, которые отличаются по структуре и которые конъюгированы на обоих концах смысловой цепи, эффективно снижают экспрессию гена-мишени. Конъюгаты 8-12 и 19 снижают экспрессию гена-мишени более эффективно, чем "Luc", который представляет собой эталонный конъюгат 3 (для конъюгатов 8-12), "Str", который представляет собой эталонный конъюгат 5 (для конъюгата 19), и необработанный контроль.

Пример 11. Временная динамика сывороточных Ttr, Aldh2 и Tmprss6 у мышей в условиях *in vivo*.  
Конъюгаты 15-18.

Применяли способ, описанный выше под заголовком "Эксперименты в условиях *in vivo*" в разделе "Общие методы".

Результаты для временной динамики сывороточного Aldh2 в когортах мышей C57BL/6 с n=6 на 14, 28 и 42 день после обработки с помощью подкожного введения 1 мг/кг конъюгатов 15 и 16, эталонных конъюгатов 6 и 7 и у индивидуумов с имитированной обработкой (ФСБ) показаны на фиг. 14 и 15. Данные на фиг. 14 и 15 свидетельствуют о том, конъюгаты согласно настоящему изобретению особенно эффективно уменьшают экспрессию гена-мишени по сравнению с отрицательным контролем (ФСБ) и эталонными конъюгатами 6 и 7, соответственно.

Результаты для временной динамики сывороточного Tmprss6 в когортах мышей c57BL/6 с n=6 на 14, 28 и 42 день после обработки с помощью подкожного введения 1 мг/кг конъюгата 18, эталонного конъюгата 8 и у индивидуумов с имитированной обработкой (ФСБ) показаны на фиг. 16. Данные на фиг. 16 свидетельствуют о том, что конъюгаты согласно настоящему изобретению особенно эффективно уменьшают экспрессию гена-мишени по сравнению с отрицательным контролем (ФСБ) и эталонным конъюгатом 8.

В целом, данные, полученные в условиях *in vivo*, показывают, что различные примерные линкеры, которые конъюгированы на обоих концах второй цепи, эффективно снижают экспрессию гена-мишени в условиях *in vivo*. Расположение линкера улучшает эффективность конъюгатов в условиях *in vivo* по сравнению с контрольным трехантенным GalNAc-линкером на 5'-конце второй цепи (эталонные конъюгаты 6, 7 и 8).

Пример 12. Исследования стабильности в сыворотке.

Применяли способ, описанный выше под заголовком "Анализ стабильности в тритосомах" в разделе "Общие методы".

На фиг. 17 показаны результаты исследований стабильности в сыворотке в отношении конъюгатов 2, 4, 5, 6 и 7. На фиг. 18 показана стабильность в сыворотке конъюгатов 2, 8, 9, 10, 11 и 12.

Все испытанные конъюгаты согласно настоящему изобретению более стабильны в сыворотке по сравнению с контролем.

Каждый из всех протестированных конъюгатов содержит один элемент GalNAc-линкер на 5'-конце и другой на 3'-конце второй цепи. МиРНК модифицированы с применением чередующихся 2'-ОМе/2'-F и каждая содержит две фосфотиоатные (PS) межнуклеотидные связи на своих 5'- и 3'-концевых двух межнуклеотидных связях, если не указано иное.

В конъюгате 4 элементы серинол-GalNAc присоединены за счет фосфодиэфирной связи. В конъюгате 5 элементы серинол-GalNAc конъюгированы за счет PS, тогда как все межнуклеотидные связи во второй цепи являются фосфодиэфирными. В конъюгате 6 вторая цепь не содержит PS. В конъюгате 7 два элемента серинол-GalNAc присоединены к каждому концу второй цепи и друг к другу за счет PS-связей на соответствующих концах. В конъюгате 8 для присоединения лиганда применяли С6-амино-модификатор на 5' и С7-амино-модификатор на 3'-конце второй цепи. В конъюгате 9 в качестве линкеров для конъюгации с обоими концами второй цепи применяли Gly-C3-амино-модификаторы, в конъюгате 10 применяли пиперидил-амино-модификаторы, в конъюгате 11 применяли С3-амино-модификаторы и в конъюгате 2 применяли элементы серинол-GalNAc. В конъюгате 2 обе концевые межнуклеотидные связи, а также нуклеотид-серинольные связи представляют собой PS. В конъюгате 12 для присоединения лиганда применяли С6-амино-модификатор на 5' и GlyC3-амино-модификатор на 3'-конце второй цепи. "Ut" обозначает необработанный образец, к которому нормировали другие образцы. "Luc" обозначает нацеленную на люциферазу миРНК (эталонный конъюгат 3), которую применяли в качестве ненацеливающего контроля и которая не уменьшает уровни мРНК-мишени.

Данные показывают, что в случае линкерной группы, происходящей из серинола, обеспеченной на 5' и 3'-концах смысловой цепи, количество фосфотиоатных (PS) связей между концевым нуклеотидом и линкером, и/или между тремя концевыми нуклеотидами в смысловой цепи можно изменять, сохраняя стабильность в сыворотке.

Пример 13.

Первичные гепатоциты человека (Lot Hu1823) и яванского макака (Lot CY367) и среды были получены от Life Technologies. Как описано производителем, первичные гепатоциты размораживали и помещали в среду для посева, состоящую из среды E Williams (Life Technologies) с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки, 1 мкМ дексаметазона в ДМСО (конечная концентрация ДМСО = 0,01%) и 3,6% об./об. смеси-А для размораживания/посева (Thermo Fisher Scientific, CM3000).

Первичные гепатоциты человека высевали на 9-луночные планшеты, покрытые коллагеном I (Life Technologies) с плотностью 30000 клеток в лунку. Гепатоциты яванского макака высевали с плотностью 45000 клеток в лунку. Конъюгат 21 и контрольную миРНК, конъюгированную с GalNAc, серийно разводили в 5 раз в диапазоне концентраций 0,006-100 нМ и добавляли сразу после посева в среду для посева. Затем планшеты инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. Затем клетки лизировали и выделяли РНК, используя способ, описанный ниже.

Последовательность конъюгата 21

Антисмысловая цепь - конъюгат 21 (SEQ ID NO: 165)

5' mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps)  
mG 3'

Смысловая цепь - STS16001BL20 (SEQ ID NO: 164)

5' [ST23 (ps)]3 C6XLT (ps) mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA  
mG mU mU (ps) mA (ps) mU 3'

Общую РНК экстрагировали с применением набора Invitrap HTS 96-well kit (Stratec Molecular GmbH, Berlin, Germany) в соответствии с инструкциями производителя со следующими изменениями в протоколе: После последней стадии промывки планшеты центрифугировали при 6000 об/мин в течение двадцати минут. Затем планшет для связывания РНК помещали сверху планшета для элюирования, и РНК элюировали двумя циклами добавления 30 мкл элюирующего буфера и инкубирования в течение двух минут при комнатной температуре с последующим центрифугированием при 1000 об/мин в течение одной минуты. Последнюю стадию элюирования выполняли центрифугированием при 1700 об/мин (4000 об/мин) в течение 3 мин. РНК хранили при -80°C.

Десять мкл раствора РНК применяли для анализа экспрессии генов с помощью количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР), выполняемого с применением наборов/последовательностей ампликонов для LPA, АСТВ (Eurogentec Deutschland GmbH, Cologne, Германия), АРОВ и PLG (BioTez GmbH, Берлин, Германия).

Реакции ОТ-кПЦР проводили с помощью ABI StepOne Plus (Applied Biosystems, часть Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США) с применением стандартных протоколов для ОТ-ПЦР (48°C 30 мин, 95°C 10 мин, 40 циклов при 95°C 15 с, затем 60°C 1 мин).

В первичных гепатоцитах анализа LPA и PLG выполняли в одноплексных анализах (праймеры: 300 нМ, зонд: 100 нМ). АРОВ (200 нМ) и АСТВ (300 нМ) выполняли в мультиплексном анализе, добавляя 100 нМ каждого зонда к стандартной смеси.

Данные были рассчитаны с применением способа сравнительной компьютерной томографии, также известного как способ  $2^{\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001 и Schmittgen and Livak, 2008). Здесь количество мРНК АРОВ, LPA или PLG, нормализованное к эндогенному эталону АСТВ относительно калибровочного стандарта (необработанный трехкратный контроль), определено формулой

$$\text{Fold-change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Если не указано иное, все значения, представленные в примере, относятся к среднему значению  $\pm$  стандартное отклонение. Значения  $IC_{50}$  рассчитывали с применением сигмоидальной 4-параметрической кривой зависимости реакции от дозы в GraphPad Prism 7.

На фиг. 19 показано подавление мРНК LPA конъюгатом 21 посредством опосредованного рецептором захвата первичными гепатоцитами человека через 24 ч после обработки миРНК ( $IC_{50}=3,6$  нМ). Уровни экспрессии мРНК LPA были нормализованы к АСТВ и относительно клеток, обработанных не нацеливающим контролем миРНК, измерены с помощью ОТ-кПЦР. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение одного эксперимента. На фиг. 20 показано выключение мРНК LPA конъюгатом 21 посредством опосредованного рецептором захвата первичными гепатоцитами яванского макака через 24 ч после обработки миРНК ( $IC_{50}=0,7$  нМ). Уровни экспрессии мРНК LPA были нормализованы к АСТВ и относительно клеток, обработанных не нацеливающим контролем миРНК, измерены с помощью ОТ-кПЦР. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение одного эксперимента.

На фиг. 21 показано выключение мРНК АРОВ конъюгатом 21 посредством опосредованного рецептором захвата первичными гепатоцитами человека через 24 ч после обработки миРНК. Уровни экспрессии мРНК АРОВ были нормализованы к АСТВ и относительно клеток, обработанных не нацеливающим контролем миРНК, измерены с помощью ОТ-кПЦР. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение одного эксперимента.

На фиг. 22 показано подавление мРНК PLG конъюгатом 21 посредством опосредованного рецептором захвата первичными гепатоцитами человека через 24 ч после обработки миРНК. Уровни экспрессии мРНК PLG были нормализованы к АСТВ и относительно клеток, обработанных не нацеливающим контролем миРНК, измерены с помощью ОТ-кПЦР. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение одного эксперимента.

Конъюгат 21 обеспечивает высокий уровень ингибирования мРНК LPA, не влияя на уровни мРНК АРОВ и PLG.

## Пример 14.

Для проверки эффективности конъюгата 21 *in vivo* самцов яванских макак использовали для проведения фармакодинамического исследования. Животные были разделены на 4 группы по 3 животных в группе. Перед дозированием готовили сыворотку, чтобы установить исходный уровень Lp(a) для каждого животного. В день 1 конъюгат 21 готовили в 0,9% физиологическом растворе, и каждое животное получало однократную дозу конъюгата 21 в дозах 0,1, 0,3, 1,0 и 3,0 мг/кг.

Серийные образцы отбирали в течение 29 дней, и уровни Lp(a) измеряли с помощью ELISA (Merco-dia, Каталожный № 10-1106-01 Lot: 27736; Упсала, Швеция). Все значения были нормализованы к исходным значениям для каждого отдельного животного, взятого перед введением дозы, и представлены как процент от начального уровня (фиг. 23). Дозы 1,0 и 3,0 мг/кг показали заметное снижение уровней Lp(a) в сыворотке (69,4 и 77,3% через 29 дней соответственно). Дозозависимый эффект приводит к дозе ED<sub>50</sub> 0,56 мг/кг (фиг. 24). Эти данные показывают, что значительное и устойчивое снижение уровня Lp(a) в сыворотке достигается с помощью однократной дозы конъюгата 21. На основании этих данных можно ожидать, что дозирование будет нечастым, не чаще, чем один раз в два месяца.

**Изложение сущности изобретения**

Далее следует изложение сущности изобретения.

1. Нуклеиновая кислота для ингибирования экспрессии LPA в клетке, содержащая по меньшей мере одну дуплексную область, которая содержит по меньшей мере часть первой цепи и по меньшей мере часть второй цепи, которая по меньшей мере частично комплементарна первой цепи, причем указанная первая цепь по меньшей мере частично комплементарна по меньшей мере части РНК, транскрибированной с гена LPA, при этом указанная первая цепь содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 9, 5, 1, 3, 7, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 или 43.

2. Нуклеиновая кислота по утверждению 1, в которой указанная первая цепь содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9, и, необязательно, указанная вторая цепь содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10; или в которой указанная первая цепь содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, и необязательно указанная вторая цепь содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6.

3. Нуклеиновая кислота для ингибирования экспрессии LPA в клетке, содержащая по меньшей мере одну дуплексную область, которая содержит по меньшей мере часть первой цепи и по меньшей мере часть второй цепи, которая по меньшей мере частично комплементарна первой цепи, причем указанная первая цепь по меньшей мере частично комплементарна по меньшей мере части РНК, транскрибированной с гена LPA, при этом указанная первая цепь содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 9 или 5.

4. Нуклеиновая кислота по любому из предшествующих утверждений, в которой каждая указанная первая цепь и/или указанная вторая цепь имеют длину от 17 до 35 нуклеотидов.

5. Нуклеиновая кислота по любому из предшествующих утверждений, в которой по меньшей мере одна дуплексная область состоит из 17-25, предпочтительно 19-25 последовательных пар нуклеотидных оснований.

6. Нуклеиновая кислота по любому из предшествующих утверждений, в которой нуклеиновая кислота:

- a) имеет тупой конец на обоих концах; или
- b) имеет липкий конец на одном конце и тупой конец на другом; или
- c) имеет липкий конец на обоих концах.

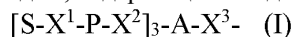
7. Нуклеиновая кислота по любому из предшествующих утверждений, в которой один или более нуклеотидов на первой и/или второй цепи модифицированы с образованием модифицированных нуклеотидов.

8. Нуклеиновая кислота по любому из предшествующих утверждений, в которой нуклеиновая кислота содержит фосфотиоатную связь между одним, двумя или тремя 3'-нуклеотидами и/или 5'-нуклеотидами одного или обоих концов первой и/или второй цепи.

9. Нуклеиновая кислота по любому из предшествующих утверждений, в которой нуклеиновая кислота конъюгирована с лигандом.

10. Нуклеиновая кислота по утверждению 9, в которой лиганд содержит (i) одну или более групп N-ацетилгалактозамина (GalNAc) или их производных, и (ii) линкер, причем линкер конъюгирует по меньшей мере с одной GalNAc группой или ее производным с образованием нуклеиновой кислоты.

11. Нуклеиновая кислота по любому из утверждений 9-10, отличающаяся тем, что указанная нуклеиновая кислота конъюгирована с лигандом, содержащим соединение формулы (I):



в которой S представляет собой сахарид, при этом предпочтительно указанный сахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин;

X<sup>1</sup> представляет собой C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-алкилен или (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>m</sub>(-CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, где m равно 1, 2 или 3;

P представляет собой фосфат или модифицированный фосфат, предпочтительно тиофосфат;

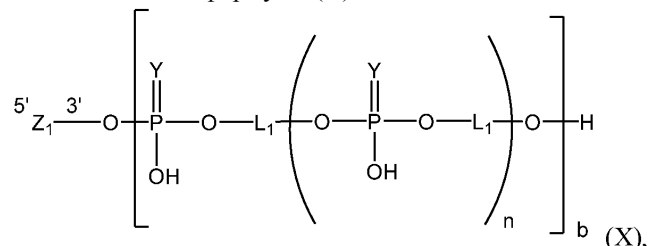
$X^2$  представляет собой алкилен или простой алкиленовый эфир формулы  $(-CH_2)_n-O-CH_2-$ , где  $n=1-6$ ;

A представляет собой элемент разветвления;

$X^3$  представляет собой мостиковый элемент;

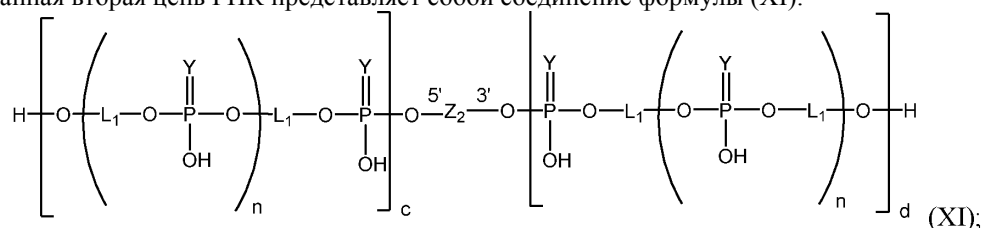
при этом нуклеиновая кислота по любому из утверждений 1-8 конъюгирована с  $X^3$  за счет фосфата или модифицированного фосфата, предпочтительно тиофосфата.

12. Нуклеиновая кислота по любому из утверждений 9-10, отличающаяся тем, что указанная первая цепь РНК представляет собой соединение формулы (X):



в которой b равно 0 или 1; и

указанная вторая цепь РНК представляет собой соединение формулы (XI):



в которой c и d независимо равны 0 или 1;

$Z_1$  и  $Z_2$  представляют собой части РНК указанных первой и второй цепей РНК, соответственно;

Y представляет собой O или S;

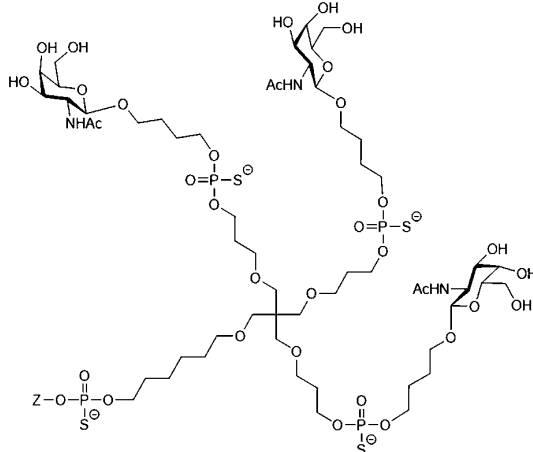
n равно 0, 1, 2 или 3; и

$L_1$  представляет собой линкер, к которому присоединен лиганд; и

при этом  $b + c + d$  равно 2 или 3.

13. Нуклеиновая кислота для ингибирования экспрессии LPA в клетке, содержащая по меньшей мере одну дуплексную область, которая содержит по меньшей мере часть первой цепи и по меньшей мере часть второй цепи, которая по меньшей мере частично комплементарна указанной первой цепи, причем указанная первая цепь по меньшей мере частично комплементарна по меньшей мере части РНК, транскрибированной с гена LPA, при этом указанная первая цепь содержит и предпочтительно состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 9, и при этом необязательно указанная вторая цепь содержит и предпочтительно состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 10.

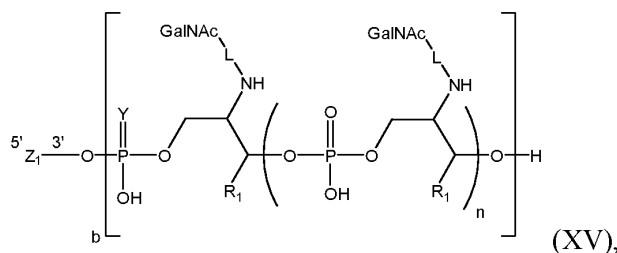
14. Нуклеиновая кислота по утверждению 13, отличающаяся тем, что указанная нуклеиновая кислота конъюгирована с лигандом и имеет следующую структуру:



где Z представляет собой нуклеиновую кислоту по утверждению 13 и предпочтительно конъюгирована с 5'-концом второй цепи.

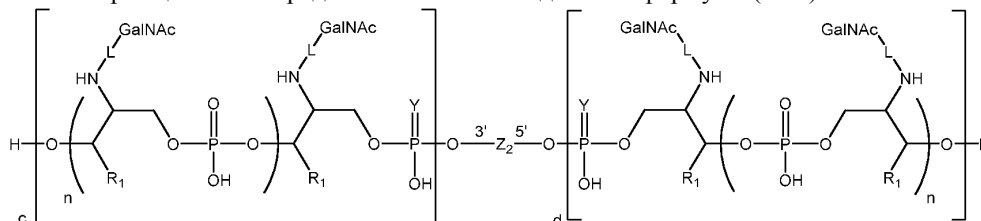
15. Нуклеиновая кислота по утверждению 14, отличающаяся тем, что указанная нуклеиновая кислота содержит две фосфотиоатные связи между каждым из трех 3'-концевых и между каждым из трех 5'-концевых нуклеотидов на указанной первой цепи и две фосфотиоатные связи между тремя концевыми нуклеотидами 3'-конца указанной второй цепи, и при этом указанный лиганд конъюгирован с 5'-концом указанной второй цепи.

16. Нуклеиновая кислота по утверждению 13, отличающаяся тем, что указанная нуклеиновая кислота конъюгирована с лигандом, причем указанная первая цепь РНК представляет собой соединение формулы (XV):



в которой b равно 0 или 1; и

указанная вторая цепь РНК представляет собой соединение формулы (XVI):



(XVI);

в которой c и d независимо равны 0 или 1;

при этом Z<sub>1</sub> и Z<sub>2</sub> представляют собой части РНК указанных первой и второй цепей РНК, соответственно;

Y представляет собой O или S;

R<sub>1</sub> представляет собой H или метил;

n равно 0, 1, 2 или 3; и

L является одинаковым или различным в формулах (XV) и (XVI) и выбран из группы, состоящей из:

-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>, где q=2-12;

-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-C(O)-, где t=2-12;

-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>s</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-, где s=1-5;

-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-NH-C(O)-, где t независимо представляет собой 1-5;

-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-, где u независимо представляет собой 1-5; и

-(CH<sub>2</sub>)<sub>v</sub>-NH-C(O)-, где v представляет собой 2-12; и

при этом концевой C(O), если он присутствует, присоединен к группе NH;

и при этом b + c + d равно 2 или 3.

17. Нуклеиновая кислота по любому из пп.13-16, содержащая последовательность и модификации, представленные ниже.

SEQ ID NO:	Последовательность	Модификации
9	5' AUAACUCUGUCCAUUACCG 3'	6162717181736152738
10	5' CGGUAAUGGACAGUUUAU 3'	3845261846364645161

где конкретные модификации обозначены номерами

1=2'F-dU,

2=2'F-dA,

3=2'F-dC,

4=2'F-dG,

5=2'-OMe-rU; 6=2'-OMe-rA; 7=2'-OMe-rC; 8=2'-OMe-rG.

18. Нуклеиновая кислота по любому из утверждений 13-16, отличающаяся тем, что нуклеотиды в положениях 2 и 14 от 5'-конца первой цепи модифицированы 2'-фтор модификацией, а нуклеотиды на второй цепи, которые соответствуют положению 11, или 13, или 11 и 13, или 11-13 первой цепи модифицированы 2'-фтор модификацией.

19. Композиция, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из утверждений 1-18 и необязательно носителем для доставки, и/или физиологически приемлемое вспомогательное вещество, и/или носитель, и/или разбавитель, и/или буфер, и/или консервант, для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно для предотвращения или лечения или снижения риска заболевания или патологии, причем заболевание или патология предпочтительно представляет собой сердечно-сосудистое заболевание, при этом сердечно-сосудистое заболевание предпочтительно представляет собой инсульт, атеро-

склероз, тромбоз, ишемическую болезнь сердца или стеноз аорты и/или любое другое заболевание или патологию, связанную с повышенными уровнями Lp(a)-содержащих частиц.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из утверждений 1-18 и дополнительно содержащая носитель для доставки, предпочтительно липосомы, и/или физиологически приемлемое вспомогательное вещество и/или носитель и/или разбавитель.

21. Применение нуклеиновой кислоты по любому из утверждений 1-18 или фармацевтической композиции по утверждению 20 для предотвращения или лечения или снижения риска заболевания или патологии, при этом заболевание или патология предпочтительно представляет собой сердечно-сосудистое заболевание, при этом сердечно-сосудистое заболевание предпочтительно представляет собой инсульт, атеросклероз, тромбоз, ишемическую болезнь сердца или стеноз аорты и любое другое заболевание или патологию, связанную с повышенными уровнями Lp(a)-содержащих частиц.

22. Способ предотвращения или лечения заболевания, расстройства или синдрома, включающий введение композиции, содержащей нуклеиновую кислоту по любому из утверждений 1-18 или композиции в соответствии с утверждениями 19-20, индивидууму, нуждающемуся в лечении, причем предпочтительно нуклеиновую кислоту или композицию вводят субъекту подкожно, внутривенно или с применением любых других способов введения, таких как пероральный, ректальный или внутривентриальный.

**Сводная таблица последовательностей**

SEQ ID NO	Название	Последовательность (5'-3')	Немодифицированный аналог последовательности (5'-3')
1	LPA-1014 первая цепь	UCGUUAACAUAAGGGGC	UCGUUAACAUAAGGGGC
2	LPA-1014 вторая цепь	GCCCCUUAUUGUUAUACGA	GCCCCUUAUUGUUAUACGA
3	LPA-1024 первая цепь	GAUAACUCUGUCCAUAUACC	GAUAACUCUGUCCAUAUACC
4	LPA-1024 вторая цепь	GGUAAUGGACAGAGUUAUC	GGUAAUGGACAGAGUUAUC
5	LPA-1038 первая цепь	AUAACUCUGUCCAUAUACCA	AUAACUCUGUCCAUAUACCA
6	LPA-1038 вторая цепь	UGGUA AUGGACAGAGUUAU	UGGUA AUGGACAGAGUUAU
7	LPA-1040 первая цепь	UAACUCUGUCCAUAUACCGU	UAACUCUGUCCAUAUACCGU
8	LPA-1040 вторая цепь	ACGGUAAUGGACAGAGUUA	ACGGUAAUGGACAGAGUUA
9	LPA-1041 первая цепь	AUAACUCUGUCCAUAUACCG	AUAACUCUGUCCAUAUACCG
10	LPA-1041 вторая цепь	CGGUAAUGGACAGAGUUAU	CGGUAAUGGACAGAGUUAU
11	LPA-1055 первая цепь	AGAAUGUGCCUCGAUAACU	AGAAUGUGCCUCGAUAACU
12	LPA-1055 вторая цепь	AGUUAUCGAGGCACAUUCU	AGUUAUCGAGGCACAUUCU
13	LPA-1057 первая цепь	AUAACUCUGUCCAUCACCA	AUAACUCUGUCCAUCACCA
14	LPA-1057 вторая цепь	UGGUGAUGGACAGAGUUAU	UGGUGAUGGACAGAGUUAU
15	LPA-1058	AUAACUCUGUCCAUCACCU	AUAACUCUGUCCAUCACCU

	первая цепь		
16	LPA-1058 вторая цепь	AGGUGAUGGACAGAGUUAU	AGGUGAUGGACAGAGUUAU
17	LPA-1061 первая цепь	UAACUCUGUCCAUAACCAU	UAACUCUGUCCAUAACCAU
18	LPA-1061 вторая цепь	AUGGUAAUGGACAGAGUUA	AUGGUAAUGGACAGAGUUA
19	LPA-1086 первая цепь	AUGUGCCUUGAUAAACUCUG	AUGUGCCUUGAUAAACUCUG
20	LPA-1086 вторая цепь	CAGAGUUAUCAAGGCACAU	CAGAGUUAUCAAGGCACAU
21	LPA-1099 первая цепь	AGUUGGUGCUGCUUCAGAA	AGUUGGUGCUGCUUCAGAA
22	LPA-1099 вторая цепь	UUCUGAAGCAGCACCAACU	UUCUGAAGCAGCACCAACU
23	LPA-1102 первая цепь	AAUAAGGGGCUGCCACAGG	AAUAAGGGGCUGCCACAGG
24	LPA-1102 вторая цепь	CCUGUGGCAGCCCCUUAUU	CCUGUGGCAGCCCCUUAUU
25	LPA-1116 первая цепь	UAACUCUGUCCAUCACCAU	UAACUCUGUCCAUCACCAU
26	LPA-1116 вторая цепь	AUGGUGAUGGACAGAGUUA	AUGGUGAUGGACAGAGUUA
27	LPA-1127 первая цепь	AUGAGCCUCGAUAAACUCUG	AUGAGCCUCGAUAAACUCUG
28	LPA-1127 вторая цепь	CAGAGUUAUCGAGGCUCAU	CAGAGUUAUCGAGGCUCAU
29	LPA-1128 первая цепь	AAUGAGCCUCGAUAAACUCU	AAUGAGCCUCGAUAAACUCU
30	LPA-1128 вторая цепь	AGAGUUAUCGAGGCUCAUU	AGAGUUAUCGAGGCUCAUU
31	LPA-1141 первая цепь	AAUGCUUCCAGGACAUUUC	AAUGCUUCCAGGACAUUUC
32	LPA-1141	GAAAUGUCCUGGAAGCAUU	GAAAUGUCCUGGAAGCAUU



	вторая цепь		
33	LPA-1151 первая цепь	ACAGUGGUGGAGAAUGUGC	ACAGUGGUGGAGAAUGUGC
34	LPA-1151 вторая цепь	GCACAUUCUCCACCACUGU	GCACAUUCUCCACCACUGU
35	LPA-1171 первая цепь	GUAUGUGCCUCGAUAACUC	GUAUGUGCCUCGAUAACUC
36	LPA-1171 вторая цепь	GAGUUAUCGAGGCACAUAC	GAGUUAUCGAGGCACAUAC
37	LPA-1177 первая цепь	UCGAUAACUCUGUCCAUCA	UCGAUAACUCUGUCCAUCA
38	LPA-1177 вторая цепь	UGAUGGACAGAGUUAUCGA	UGAUGGACAGAGUUAUCGA
39	LPA-1189 первая цепь	UGUCACUGGACAUUGUGUC	UGUCACUGGACAUUGUGUC
40	LPA-1189 вторая цепь	GACACAAUGUCCAGUGACA	GACACAAUGUCCAGUGACA
41	LPA-1244 первая цепь	CUGGGAUCCAUGGUGUAAC	CUGGGAUCCAUGGUGUAAC
42	LPA-1244 вторая цепь	GUUACACCAUGGAUCCAG	GUUACACCAUGGAUCCAG
43	LPA-1248 первая цепь	AGAUGACCAAGCUUGGCAG	AGAUGACCAAGCUUGGCAG
44	LPA-1248 вторая цепь	CUGCCAAGCUUGGUCAUCU	CUGCCAAGCUUGGUCAUCU
45	LPA: (верхний) человек	AAGTGCCTTGCGACGTCC	AAGTGCCTTGCGACGTCC
46	LPA: (нижний) человек	CCTGGACTGTGGGGCTTT	CCTGGACTGTGGGGCTTT
47	LPA: (зонд) человек	CTGTTTCTGAACAAGCACCAAC GGAGC	CTGTTTCTGAACAAGCACCA CGGAGC
48	LPA	GTGTCCTCGCAACGTCCA	GTGTCCTCGCAACGTCCA

	(верхний) яванский макак		
49	LPA (нижний) яванский макак	GACCCCGGGGCTTTG	GACCCCGGGGCTTTG
50	LPA (зонд) яванский макак	TGGCTGTTTCTGAACAAGCACC AATGG	TGGCTGTTTCTGAACAAGCAC CAATGG
51	АРОВ (верхний) человек	TCATTCCTTCCCCAAAGAGACC	TCATTCCTTCCCCAAAGAGAC C
52	АРОВ (нижний) человек	CACCTCCGTTTTGGTGGTAGAG	CACCTCCGTTTTGGTGGTAGA G
53	АРОВ (зонд) человек	CAAGCTGCTCAGTGAGGCAA CACATTA	CAAGCTGCTCAGTGAGGCAA CACATTA
54	бета-актин (верхний) человек	GCATGGGTCAGAAGGATTCCT AT	GCATGGGTCAGAAGGATTCCT AT
55	бета-актин (нижний) человек	TGTAGAAGGTGTGGTGCCAGA TT	TGTAGAAGGTGTGGTGCCAGA TT
56	бета-актин (зонд) человек	TCGAGCACGGCATCGTCACCA A	TCGAGCACGGCATCGTCACCA A
57	бета-актин (верхний) яванский макак	AAGGCCAACC GCGAGAAG	AAGGCCAACC GCGAGAAG
58	бета-актин (нижний)яван ский макак	AGAGGCGTACAGGGACAGCA	AGAGGCGTACAGGGACAGCA

59	бета-актин (зонд) яванский макак	TGAGACCTTCAACACCCCAGCC ATGTAC	TGAGACCTTCAACACCCCAGC CATGTAC
60	РРІВ (верхний) человек	AGATGTAGGCCGGGTGATCTTT	AGATGTAGGCCGGGTGATCTT T
61	РРІВ (нижний) человек	GTAGCCAAATCCTTTCTCTCCT GT	GTAGCCAAATCCTTTCTCTCCT GT
62	РРІВ (зонд) человек	TGTTCCAAAACAGTGGATAAT TTTGTGGCC	TGTTCCAAAACAGTGGATAA TTTTGTGGCC
63	LPA: (верхний) человек	AAGTGTCCCTGCGACGTCC	AAGTGTCCCTGCGACGTCC
64	LPA: (нижний) человек	CCTGGACTGTGGGGCTTT	CCTGGACTGTGGGGCTTT
65	LPA: (зонд) человек	CTGTTTCTGAACAAGCACCAAC GGAGC	CTGTTTCTGAACAAGCACCA CGGAGC
66	LPA (верхний) яванский макак	GTGTCCTCGCAACGTCCA	GTGTCCTCGCAACGTCCA
67	LPA (нижний) яванский макак	GACCCCGGGGCTTTG	GACCCCGGGGCTTTG
68	LPA (зонд) яванский макак	TGGCTGTTTCTGAACAAGCAC AATGG	TGGCTGTTTCTGAACAAGCAC CAATGG
69	АРОВ (верхний) человек	TCATTCCTTCCCAAAGAGACC	TCATTCCTTCCCAAAGAGAC C
70	АРОВ	CACCTCCGTTTTGGTGGTAGAG	CACCTCCGTTTTGGTGGTAGA

	(нижний) человек		G
71	АРОВ (зонд) человек	CAAGCTGCTCAGTGGAGGCAA CACATTA	CAAGCTGCTCAGTGGAGGCAA CACATTA
72	бета-актин (верхний) человек	GCATGGGTCAGAAGGATTCCT AT	GCATGGGTCAGAAGGATTCCT AT
73	бета-актин (нижний) человек	TGTAGAAGGTGTGGTGCCAGA TT	TGTAGAAGGTGTGGTGCCAGA TT
74	бета-актин (зонд) человек	TCGAGCACGGCATCGTCACCA A	TCGAGCACGGCATCGTCACCA A
75	Модифициро ванная SEQ ID NO: 1	5381616272616284847	UCGUUAUACAAUAAGGGGC
76	Модифициро ванная SEQ ID NO: 2	4737351615451616382	GCCCCUUAUUGUUAUACGA
77	Модифициро ванная SEQ ID NO: 3	8252635354537251637	GAUAACUCUGUCCAUIACC
78	Модифициро ванная SEQ ID NO: 4	4816254827282815253	GGUAAUGGACAGAGUUAUC
79	Модифициро ванная SEQ ID NO: 5	6162717181736152736	AUAACUCUGUCCAUIACCA
80	Модифициро ванная SEQ ID NO: 6	1845261846364645161	UGGUAAUGGACAGAGUUAU
81	Модифициро ванная SEQ ID NO: 7	5263535453725163745	UAACUCUGUCCAUIACCGU

82	Модифицированная SEQ ID NO: 8	2748162548272828152	ACGGUAAUGGACAGAGUUA
83	Модифицированная SEQ ID NO: 9	6162717181736152738	AUAACUCUGUCCAUAACCG
84	Модифицированная SEQ ID NO: 10	3845261846364645161	CGGUAAUGGACAGAGUUAU
85	Модифицированная SEQ ID NO: 11	6462545473538252635	AGAAUGUGCCUCGAUAACU
86	Модифицированная SEQ ID NO: 12	2815253828472725171	AGUUAUCGAGGCACAUUCU
87	Модифицированная SEQ ID NO: 13	6162717181736172736	AUAACUCUGUCCAUCACCA
88	Модифицированная SEQ ID NO: 14	1845461846364645161	UGGUGAUGGACAGAGUUAU
89	Модифицированная SEQ ID NO: 15	6162717181736172735	AUAACUCUGUCCAUCACCU
90	Модифицированная SEQ ID NO: 16	2845461846364645161	AGGUGAUGGACAGAGUUAU
91	Модифицированная SEQ ID NO: 17	5263535453725163725	UAACUCUGUCCAUAACCAU
92	Модифицированная SEQ ID NO: 18	2548162548272828152	AUGGUAAUGGACAGAGUUA
93	Модифицированная SEQ ID NO: 19	6181837154616271718	AUGUGCCUUGAUAAUCUCUG

	анная SEQ ID NO: 19		
94	Модифициро анная SEQ ID NO: 20	3646451617264836361	CAGAGUUAUCAAGGCACAU
95	Модифициро анная SEQ ID NO: 21	6451845471835172826	AGUUGGUGCUGCUUCAGAA
96	Модифициро анная SEQ ID NO: 22	1535462836472736271	UUCUGAAGCAGCACCAACU
97	Модифициро анная SEQ ID NO: 23	6252648483547363648	AAUAAGGGGCUGCCACAGG
98	Модифициро анная SEQ ID NO: 24	3718184728373715251	CCUGUGGCAGCCCUUAUU
99	Модифициро анная SEQ ID NO: 25	5263535453725363725	UAACUCUGUCCAUCACCAU
100	Модифициро анная SEQ ID NO: 26	2548182548272828152	AUGGUGAUGGACAGAGUUA
101	Модифициро анная SEQ ID NO: 27	6182837174616271718	AUGAGCCUCGAUAACUCUG
102	Модифициро анная SEQ ID NO: 28	3646451617464835361	CAGAGUUAUCGAGGCUCAU
103	Модифициро анная SEQ ID NO: 29	6254647353825263535	AAUGAGCCUCGAUAACUCU
104	Модифициро анная SEQ ID	2828152538284717251	AGAGUUAUCGAGGCUCAUU

	NO: 30		
105	Модифицированная SEQ ID NO: 31	6254715372846361517	AAUGCUUCCAGGACAUUUC
106	Модифицированная SEQ ID NO: 32	4626181735482647251	GAAAUGUCCUGGAAGCAUU
107	Модифицированная SEQ ID NO: 33	6364548184646254547	ACAGUGGUGGAGAAUGUGC
108	Модифицированная SEQ ID NO: 34	4727251717363727181	GCACAUUCUCCACCACUGU
109	Модифицированная SEQ ID NO: 35	8161818371746162717	GUAUGUGCCUCGAUACUC
110	Модифицированная SEQ ID NO: 36	4645161746483636163	GAGUUAUCGAGGCACAUAC
111	Модифицированная SEQ ID NO: 37	5382526353545372536	UCGAU AACUCUGUCCAUCA
112	Модифицированная SEQ ID NO: 38	1825482728281525382	UGAUGGACAGAGUUAUCGA
113	Модифицированная SEQ ID NO: 39	5453635482725181817	UGUCACUGGACAUUGUGUC
114	Модифицированная SEQ ID NO: 40	4636362545372818272	GACACAAUGUCCAGUGACA
115	Модифицированная SEQ ID NO: 41	7184825372548181627	CUGGGAUCCAUGGUGUAAC

116	Модифицированная SEQ ID NO: 42	4516363725482537364	GUUACACCAUGGAUCCAG
117	Модифицированная SEQ ID NO: 43	6461827362835184728	AGAUGACCAAGCUUGGCAG
118	Модифицированная SEQ ID NO: 44	3547362835184536171	CUGCCAAGCUUGGUCAUCU
119	GalNAc-LPA-1038-L1 первая цепь	OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeA	AUAACUCUGUCCAUIACCA
120	GalNAc-LPA-1038-L1 вторая цепь	[ST23 (ps)] <sub>3</sub> long trebler (ps)FU-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU	UGGUA AUGGACAGAGUUAU
121	GalNAc-LPA-1038-L6 первая цепь	OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeA	AUAACUCUGUCCAUIACCA
122	GalNAc-LPA-1038-L6 вторая цепь	[ST23 (ps)] <sub>3</sub> ST43 (ps)FU-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU	UGGUA AUGGACAGAGUUAU
123	GalNAc-LPA-1041-L1 первая цепь	OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeG	AUAACUCUGUCCAUIACCG
124	GalNAc-LPA-1041-L1 вторая цепь	[ST23 (ps)] <sub>3</sub> long trebler (ps) FC-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-	CGGUA AUGGACAGAGUUAU



		(ps)-FU	
125	GalNAc-LPA- 1041-L6 первая цепь	OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA- OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU- OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA- OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeG	AUAACUCUGUCCAUAUACCG
126	GalNAc-LPA- 1041-L6 вторая цепь	[ST23 (ps)] <sub>3</sub> ST43 (ps) FC-OMeG- FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG- FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA- FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU	CGGUAAUGGACAGAGUUUAU
127	STS16001AL3 3	mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU (ps) Ser(GN)	UUUAUAGAGCAAGAACACUGU U
128	STS16001BL2 0	Ser(GN) (ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA	AACAGUGUUCUUGCUCUAUA A
129	STS16001A	mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU	UUUAUAGAGCAAGAACACUGU U
130	STS16001BV1 L42	Ser(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) Ser(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUA A
131	STS16001V1B	fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA	AACAGUGUUCUUGCUCUAUA A
132	STS18001A	mU (ps) fC (ps) mG fA mA fG mU fA mU fU mC fC mG fC mG fU mA (ps) fC (ps) mG	UCGAAGUAUCCGCGUACG
133	STS18001BL4	[(ST23) (ps)] <sub>3</sub> C4XLT (ps) fC mG fU mA fC mG fC mG fG mA fA mU fA mC fU mU fC (ps) mG (ps) fA	CGUACGCGAAUACUUCGA
134	STS16001BL4	[(ST23) (ps)] <sub>3</sub> C4XLT(ps)fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU	AACAGUGUUCUUGCUCUAUA A

		(ps) mA (ps) fA	
135	X0373A	mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG	AUAACUCUGUCCAUUACCG
136	X0373B	Ser(GN) (ps) fC (ps) mG (ps) fG mU fA mA fU mG fG mA fC mA fG mA fG mU fU (ps) mA (ps) fU (ps) Ser(GN)	CGGUAAUGGACAGAGUUAU
137	STS2041B	ST23 (ps) ST23 (ps) ST23 (ps) C6XLT (ps) fC mG fG mU fA mA fU mG fG mA fC mA fG mA fG mU fU (ps) mA (ps) fU	CGGUAAUGGACAGAGUUAU
138	X0125A	mC (ps) fU (ps) mU fA mC fU mC fU mC fG mC fC mC fA mA fG mC (ps) fG (ps) mA	CUUACUCUCGCCCAAGCGA
139	X0125B	[(ST23) (ps)] <sub>3</sub> (C6XLT) (ps) fU mC fG mC fU mU fG mG fG mC fG mA fG mA fG mU fA (ps) mA (ps) fG	UCGCUUGGGCGAGAGUAAG
140	Зонд на основе SEQ ID NO: 50	BHQ1- TGGCTGTTTCTGAACAAGCACC AATGG-FAM	TGGCTGTTTCTGAACAAGCAC CAATGG
141	Зонд на основе SEQ ID NO: 56	BHQ1- TCGAGCACGGCATCGTCACCA A-VIC	TCGAGCACGGCATCGTCACCA A
142	STS16001BV1 L75	Ser(GN) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA Ser(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUA A
143	STS16001BV1 6L42	Ser(GN) (ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU mA fA (ps) Ser(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUA A
144	STS16001BV2 0L75	Ser(GN) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU mA fA Ser(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUA A

145	STS16001BV1 L94	Ser(GN) (ps) Ser(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) Ser(GN) (ps) Ser(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUA A
146	STS16001V1B L96	C6Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) C7Am(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUA A
147	STS16001V1B L97	GlyC3Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) GlyC3Am(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUA A
148	Коньюгат 10 вторая цепь	PipAm(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) PipAm(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUA A
149	STS16001V1B L88	C3Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) C3Am(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUA A
150	STS16001V1B L87	C6Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) GlyC3Am(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUA A
151	Коньюгат 15 антисмысловая я цепь	mU (ps) fC (ps) mU fU mC fU mU fA mA fA mC fU mG fA mG fU mU (ps) fU (ps) mC	UCUUCUUAACUGAGUUUC
152	Коньюгат 15 смысловая цепь	Ser(GN) (ps) fG (ps) mA (ps) fA mA fC mU fC mA fG mU fU mU fA mA fG mA fA (ps) mG (ps) fA (ps) Ser(GN)	GAAACUCAGUUUAAGAAGA
153	Коньюгат 16 антисмысловая	mA (ps) fU (ps) mG fU mA fG mC fC mG fA mG fG mA fU mC fU mU	AUGUAGCCGAGGAUCUUCU

	я цепь	(ps) fC (ps) mU	
154	Конъюгат 16 антисмысловая я цепь	Ser(GN) (ps) fA (ps) mG (ps) fA mA fG mA fU mC fC mU fC mG fG mC fU mA fC (ps) mA (ps) fU (ps) Ser(GN)	AGAAGA UCCUCGGCUACA U
155	Конъюгат 18 антисмысловая я цепь	mA (ps) fA (ps) mC fC mA fG mA fA mG fA mA fG mC fA mG fG mU (ps) fG (ps) mA	AACCAGAAGAAGCAGGUGA
156	Конъюгат 18 смысловая цепь	Ser(GN) (ps) fU (ps) mC (ps) fA mC fC mU fG mC fU mU fC mU fU mC fU mG fG (ps) mU (ps) fU (ps) Ser(GN)	UCACCUGCUUCUUCUGGUU
157	STS16001BV1	fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA	AACAGUGUUCUUGCUCUAUA A
158	Эталонный конъюгат 6 смысловая цепь	[ST23 (ps)] <sub>3</sub> ltrb (ps) fG mA fA mA fC mU fC mA fG mU fU mU fA mA fG mA fA (ps) mG (ps) fA	GAAACUCAGUUUAAGAAGA
159	Эталонный конъюгат 7 смысловая цепь	[ST23 (ps)] <sub>3</sub> ltrb (ps) fA mG fA mA fG mA fU mC fC mU fC mG fG mC fU mA fC (ps) mA (ps) fU	AGAAGA UCCUCGGCUACA U
160	Эталонный конъюгат 8 антисмысловая я цепь	mU (ps) fA (ps) mC fC mA fG mA fA mG fA mA fG mC fA mG fG mU (ps) fG (ps) mA	UACCAGAAGAAGCAGGUGA
161	Эталонный конъюгат 8 смысловая цепь	[ST23 (ps)] <sub>3</sub> ST41 (ps) fU mC fA mC fC mU fG mC fU mU fC mU fU mC fU mG fG (ps) mU (ps) fA	UCACCUGCUUCUUCUGGUA
162	Эталонный конъюгат 9 смысловая цепь	[ST23 (ps)] <sub>3</sub> C6XLT (ps) fC mG fG mU fA mA fU mG fG mA fC mA fG mA fG mU fU (ps) mA (ps) fU	CGGUAAUGGACAGAGUUAU
163	Конъюгат 21 смысловая цепь без лиганда	mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU mU (ps) mA (ps) mU	CGGUAAUGGACAGAGUUAU
164	Конъюгат 21 смысловая цепь	[ST23 (ps)] <sub>3</sub> C6XLT (ps) mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU mU (ps) mA (ps) mU	CGGUAAUGGACAGAGUUAU
165	Конъюгат 21 антисмысловая я цепь	mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG	AUAACUCUGUCCA U UACCG

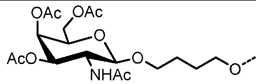
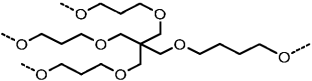
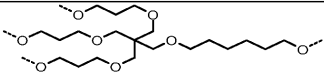
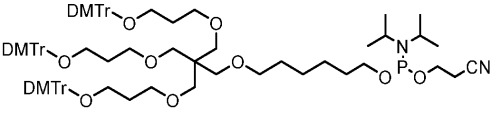
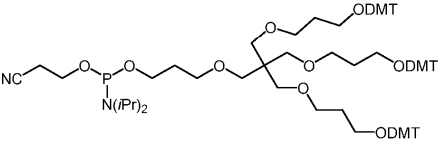
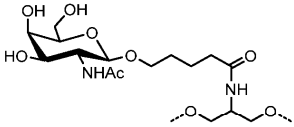
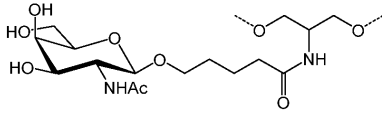
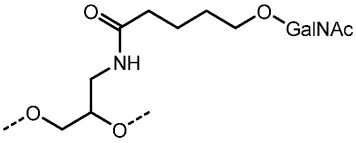
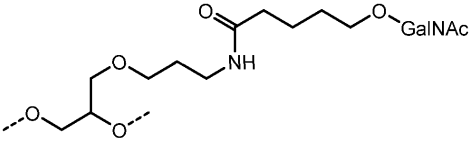
Одна последовательность может иметь более одного названия. В этих случаях одно из этих названий приведено в сводной таблице последовательностей.

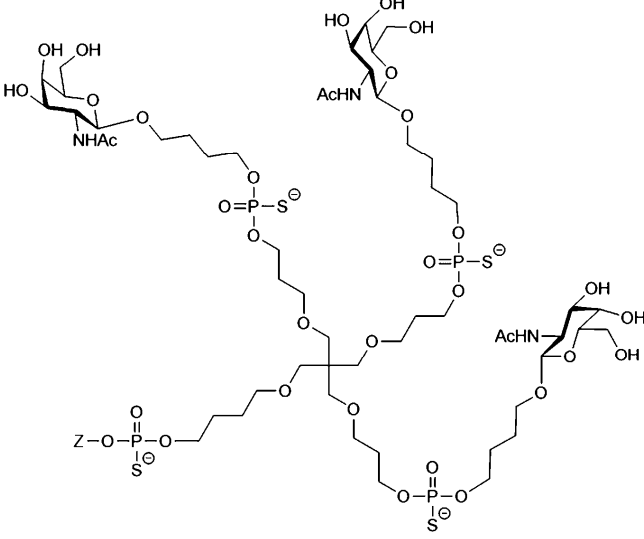
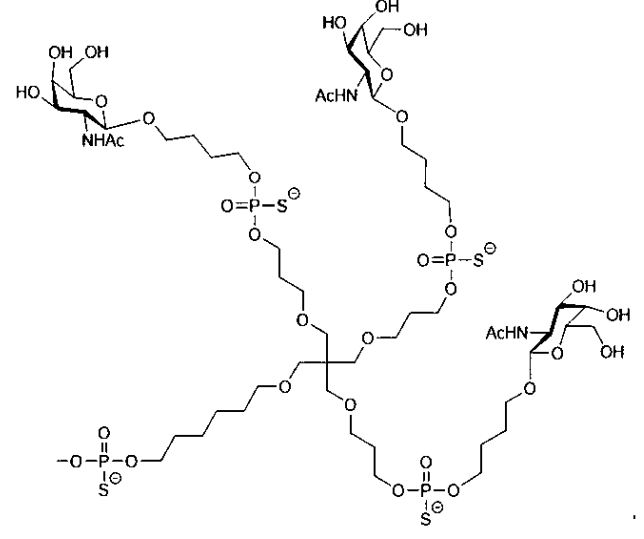
Если в последовательности РНК указаны конкретные линкеры и/или модифицированные связи, та-

кие как (ps) и [ST23 (ps)]<sub>3</sub> ST41 (ps) и т.д., они представляют собой необязательные части последовательности, но являются предпочтительным вариантом реализации этой последовательности.

Могут быть использованы следующие сокращения, в частности, в перечисленных последовательностях.

Аббревиатура	Значение
1	2'F-dU
2	2'F-dA
3	2'F-dC
4	2'F-dG
5	2'OMe-rU
6	2'OMe-rA
7	2'OMe-rC
8	2'OMe-rG
mA, mU, mC, mG, OMeA, OMeU, OMeC, OMeG	2'OMe РНК
2'-OMe	2'-О-Метил модификация
fA, fU, fC, fG	2' дезокси-2'-F РНК нуклеотиды

2'-F, 2'-фтор, 2' фтор	2'-фтор модификация
(ps)	фосфотиоат
(vp)	Винил-(Е)-фосфоронат
ivA, ivC, ivU, ivG	Инвертированная РНК (3'-3')
FAM	6-карбоксифлуоресцеин
BHQ	Гуипитель Черная дыра 1
ST23	
ST41/C4XLT	
ST43 (или C6XLT)	
ST43-phos/C6XLT-phos	
Длинный утроитель/Itrb/STKS (фосфорамидит)	
Ser(GN)	
Ser(GN) (фосфорамидит)	
C3Am(GN)	
GlyC3Am(GN)	

C6Am(GN)	
C7Am(GN)	
PipAm(GN)	
<p>[ST23 (ps)]<sub>3</sub> C4XLT (ps)  = [ST23 (ps)]<sub>3</sub> ST41 (ps)  = L4</p>	
<p>[ST23 (ps)]<sub>3</sub> C6XLT (ps)  = [ST23 (ps)]<sub>3</sub> ST43 (ps)  = L6</p>	

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нуклеиновая кислота для ингибирования экспрессии LPA в клетке, содержащая по меньшей мере одну дуплексную область, которая содержит по меньшей мере часть первой цепи и по меньшей мере часть второй цепи, которая по меньшей мере частично комплементарна указанной первой цепи, при этом указанная первая цепь по меньшей мере частично комплементарна по меньшей мере части РНК, транскрибированной с гена LPA, при этом указанная первая цепь содержит нуклеотидную последовательность

$$5' \text{ mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG } 3'$$

(SEQ ID NO: 165),

и причем указанная вторая цепь содержит нуклеотидную последовательность

$$5' \text{ mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU mU (ps) mA (ps) mU } 3' \text{ (SEQ ID NO: 163);}$$

причем fA, fC, fG и fU обозначают 2'-дезоксид-2'-фтор рибонуклеотиды;

mA, mC, mG и mU обозначают 2'-О-метил рибонуклеотиды и

(ps) обозначает фосфотиоатную связь.

2. Нуклеиновая кислота по п.1, отличающаяся тем, что указанная первая цепь состоит из нуклеотидной последовательности

$$5' \text{ mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG } 3'$$

(SEQ ID NO: 165),

причем fA, fC, fG и fU обозначают 2'-дезоксид-2'-фтор рибонуклеотиды;

mA, mC, mG и mU обозначают 2'-О-метил рибонуклеотиды и

(ps) обозначает фосфотиоатную связь.

3. Нуклеиновая кислота по п.1 или 2, отличающаяся тем, что указанная вторая цепь состоит из нуклеотидной последовательности

$$5' \text{ mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU mU (ps) mA (ps) mU } 3' \text{ (SEQ ID NO: 163);}$$

причем fA, fC, fG и fU обозначают 2'-дезоксид-2'-фтор рибонуклеотиды;

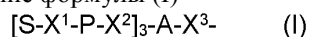
mA, mC, mG и mU обозначают 2'-О-метил рибонуклеотиды и

(ps) обозначает фосфотиоатную связь.

4. Нуклеиновая кислота по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что указанная нуклеиновая кислота конъюгирована с лигандом.

5. Нуклеиновая кислота по п.4, отличающаяся тем, что указанный лиганд содержит: (i) одну или более групп N-ацетилгалактозамина (GalNAc) или их производных и (ii) линкер, причем указанный линкер обеспечивает конъюгацию по меньшей мере одной группы GalNAc или по меньшей мере одного ее производного с указанной нуклеиновой кислотой.

6. Нуклеиновая кислота по п.4, отличающаяся тем, что указанная нуклеиновая кислота конъюгирована с лигандом, содержащим соединение формулы (I)



в которой S представляет собой сахарид;

X<sup>1</sup> представляет собой C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-алкилен или (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>m</sub>(-CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, где m равно 1, 2 или 3;

P представляет собой фосфат или модифицированный фосфат;

X<sup>2</sup> представляет собой алкилен или простой алкиленовый эфир формулы (-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-CH<sub>2</sub>-,

где n=1-6;

A представляет собой элемент разветвления;

X<sup>3</sup> представляет собой мостиковый элемент;

при этом нуклеиновая кислота по любому из пп.1-4 конъюгирована с X<sup>3</sup> за счет фосфата или модифицированного фосфата.

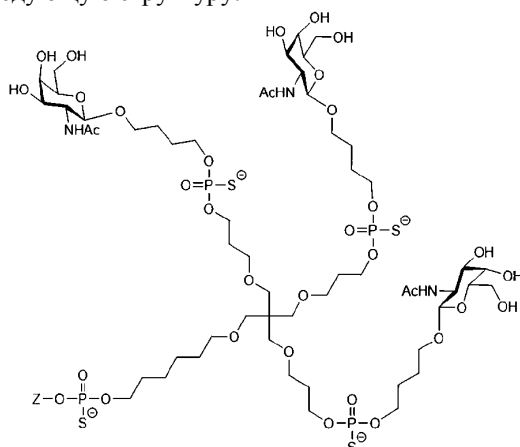
7. Нуклеиновая кислота по п.6, отличающаяся тем, что указанный сахарид (S) представляет собой N-ацетилгалактозамин.

8. Нуклеиновая кислота по п.6 или 7, отличающаяся тем, что модифицированный фосфат представляет собой тиофосфат.

9. Нуклеиновая кислота по пп.6-8, отличающаяся тем, что указанная нуклеиновая кислота конъюгирована с X<sup>3</sup> посредством 5'-конца второй цепи.



10. Нуклеиновая кислота по п.4, отличающаяся тем, что указанная нуклеиновая кислота конъюгирована с лигандом и имеет следующую структуру:



где Z представляет собой нуклеиновую кислоту по любому из пп.1-3.

11. Нуклеиновая кислота по п.10, отличающаяся тем, что указанный лиганд конъюгирован с 5'-концом второй цепи.

12. Нуклеиновая кислота по любому из пп.4-11, отличающаяся тем, что указанная вторая цепь содержит нуклеотидную последовательность

5' [ST23 (ps)]3 C6XLT (ps) mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU

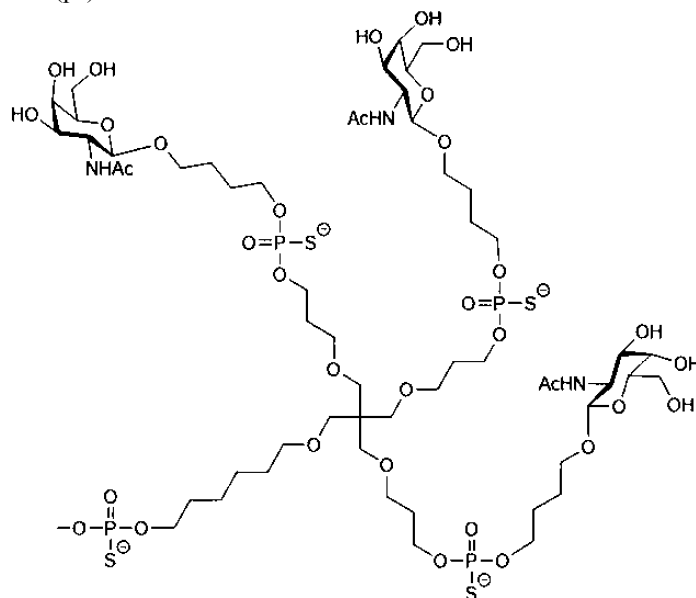
mU (ps) mA (ps) mU 3' (SEQ ID NO: 164);

причем fA, fC, fG и fU обозначают 2'-дезоксидезокси-2'-фтор рибонуклеотиды;

mA, mC, mG и mU обозначают 2'-О-метил рибонуклеотиды; и

(ps) обозначает фосфотиоатную связь; и

[ST23 (ps)]3 C6XLT (ps) обозначает



13. Нуклеиновая кислота по п.12, причем указанная вторая цепь состоит из нуклеотидной последовательности

5' [ST23 (ps)]3 C6XLT (ps) mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU

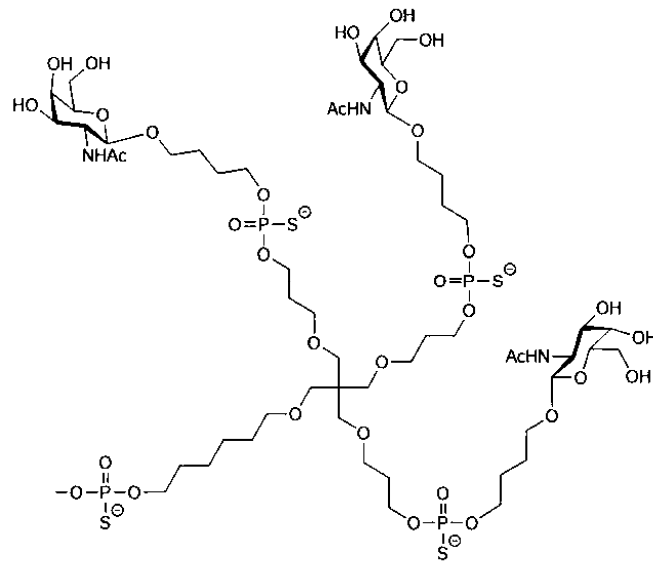
mU (ps) mA (ps) mU 3' (SEQ ID NO: 164);

причем fA, fC, fG и fU обозначают 2'-дезоксидезокси-2'-фтор рибонуклеотиды;

mA, mC, mG и mU обозначают 2'-О-метил рибонуклеотиды; и

(ps) обозначает фосфотиоатную связь; и

[ST23 (ps)]3 C6XLT (ps) обозначает

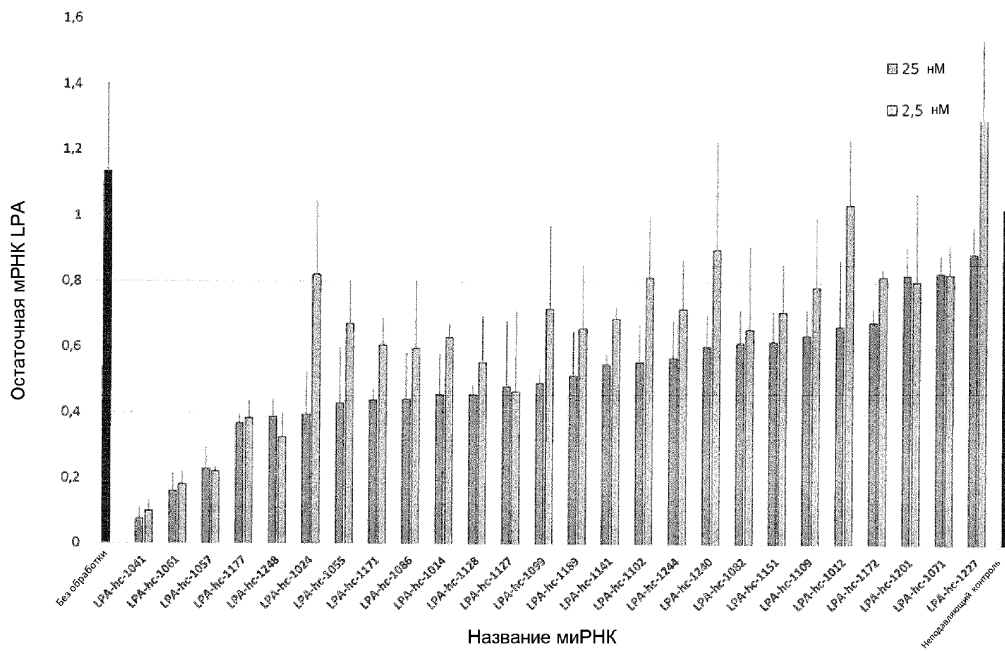


14. Фармацевтическая композиция, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп.1-13 в эффективном количестве и дополнительно содержащая по меньшей мере один из носителя для доставки, физиологически приемлемого вспомогательного вещества, носителя и разбавителя.

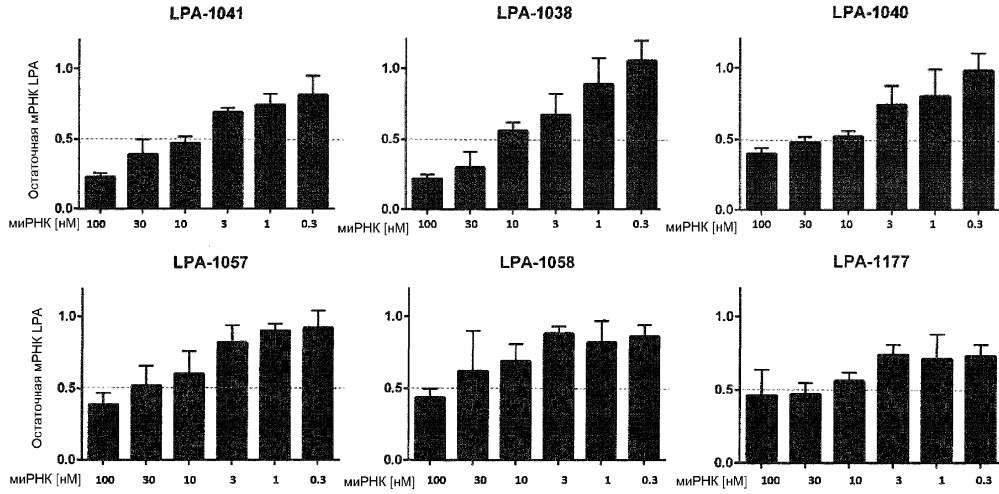
15. Применение нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-13 или фармацевтической композиции по п.14 для предотвращения или лечения или снижения риска заболевания или патологии.

16. Применение по п.15, отличающееся тем, что указанное заболевание или патология представляет собой сердечно-сосудистое заболевание.

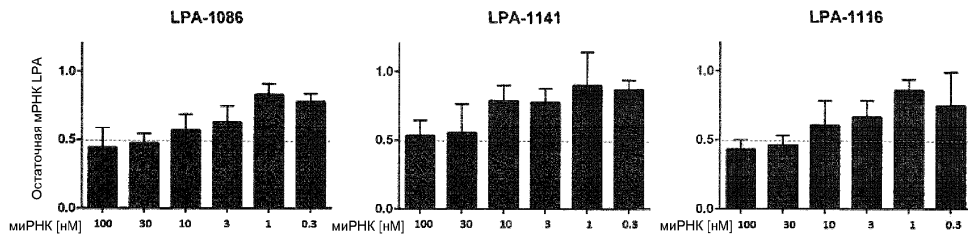
17. Применение по п.16, отличающееся тем, что указанное сердечно-сосудистое заболевание представляет собой инсульт, атеросклероз, тромбоз, ишемическую болезнь сердца или стеноз аорты или любое другое заболевание или патологию, которые связаны с повышенными уровнями частиц Lp(a).



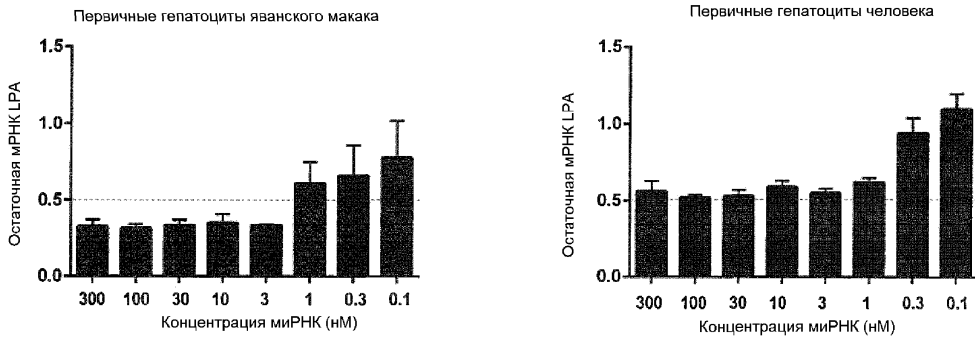
Фиг. 1



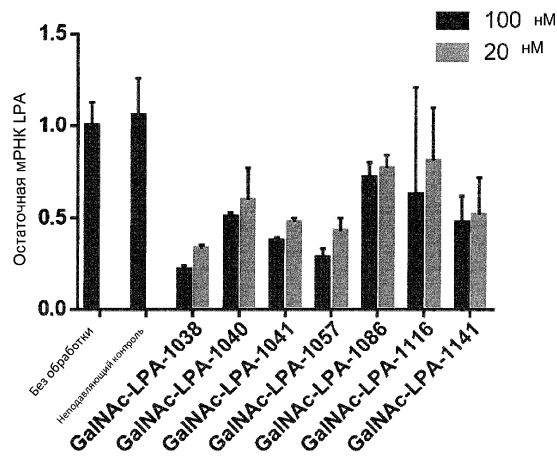
Фиг. 2А



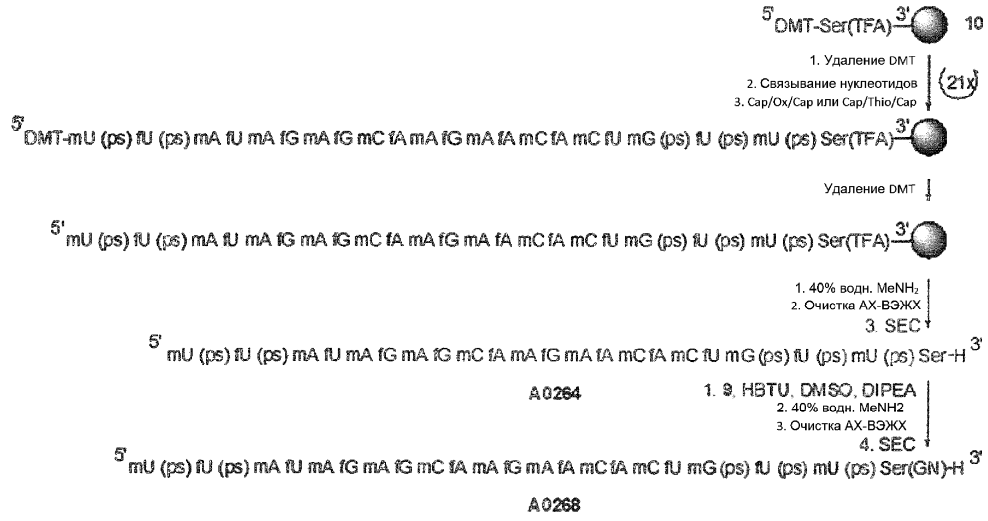
Фиг. 2В



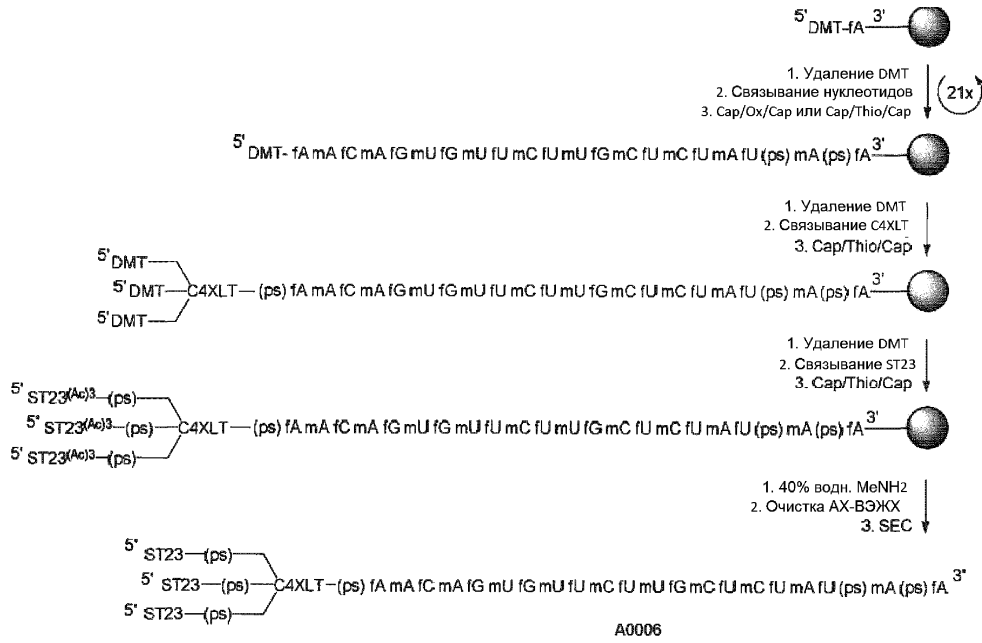
Фиг. 3



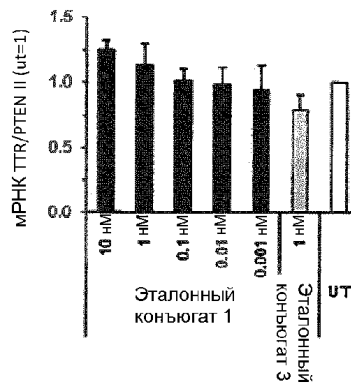
Фиг. 4



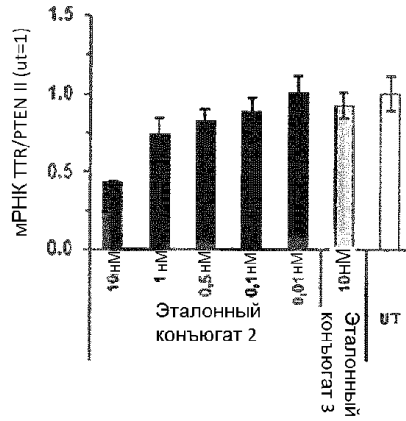
Фиг. 5



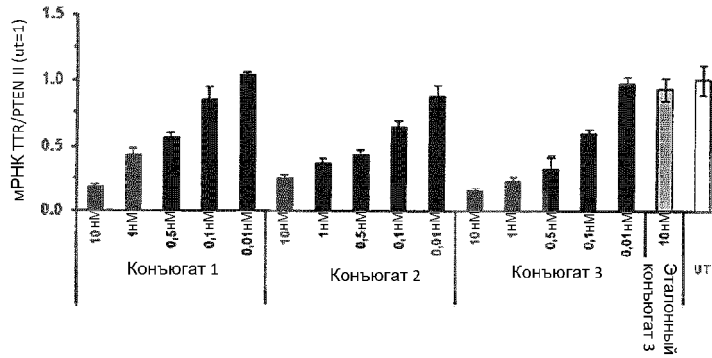
Фиг. 6



Фиг. 7А

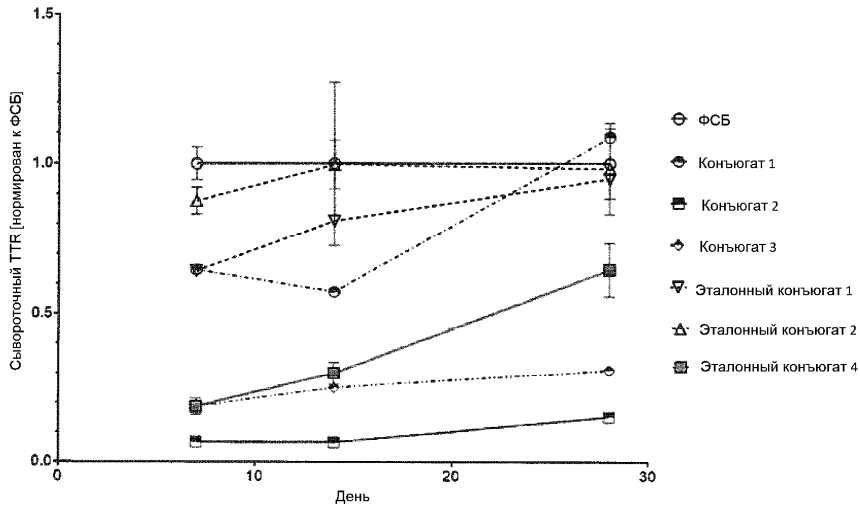


Фиг. 7B

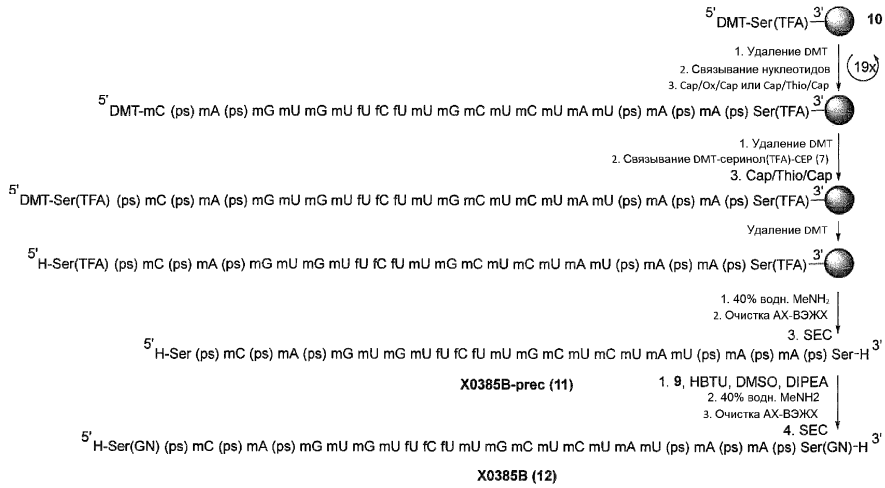


Фиг. 7C

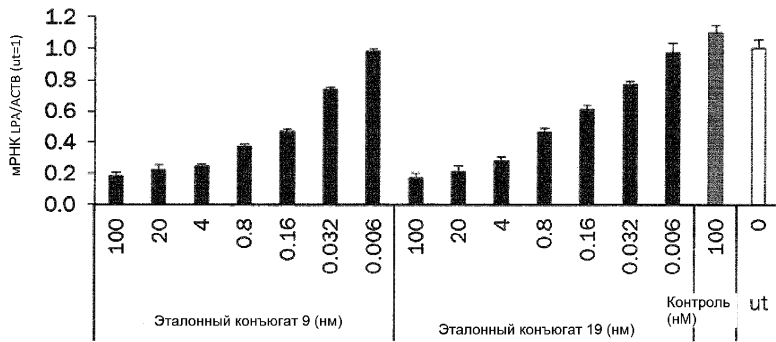
Временная динамика сывороточного TTR у мышей C57BL/6 после п/к применения 1 мг/кг миРНК-конъюгата (среднее значение ± стандартное отклонение, n=4)



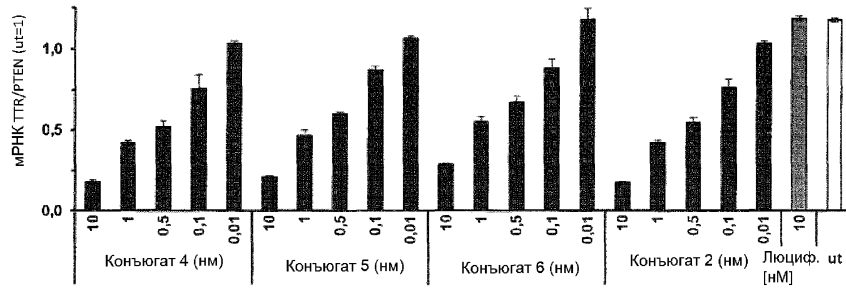
Фиг. 8



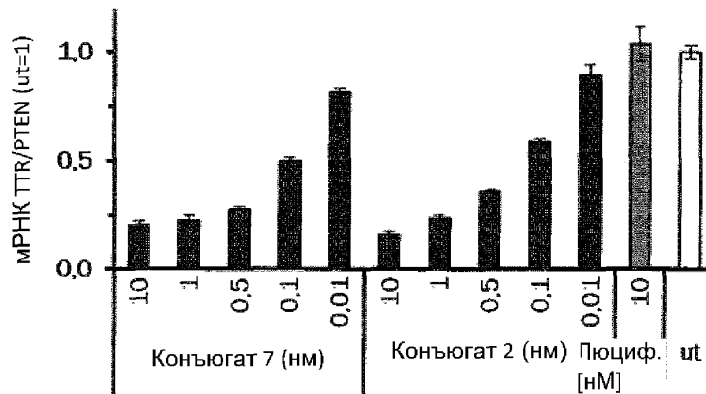
Фиг. 9



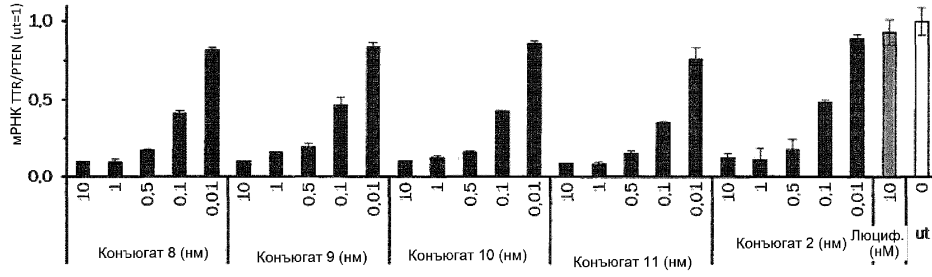
Фиг. 10



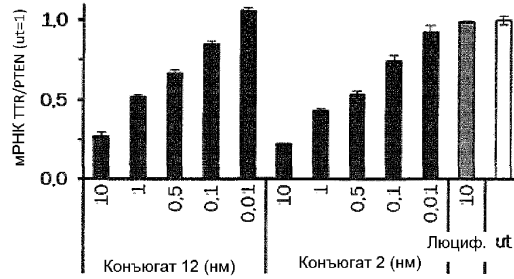
Фиг. 11А



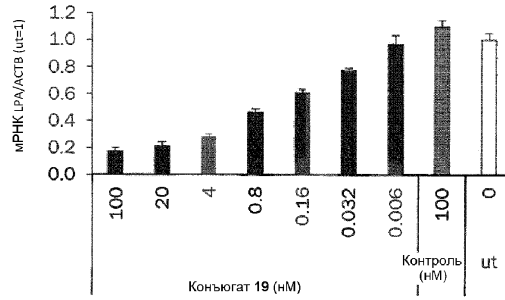
Фиг. 11В



Фиг. 12А

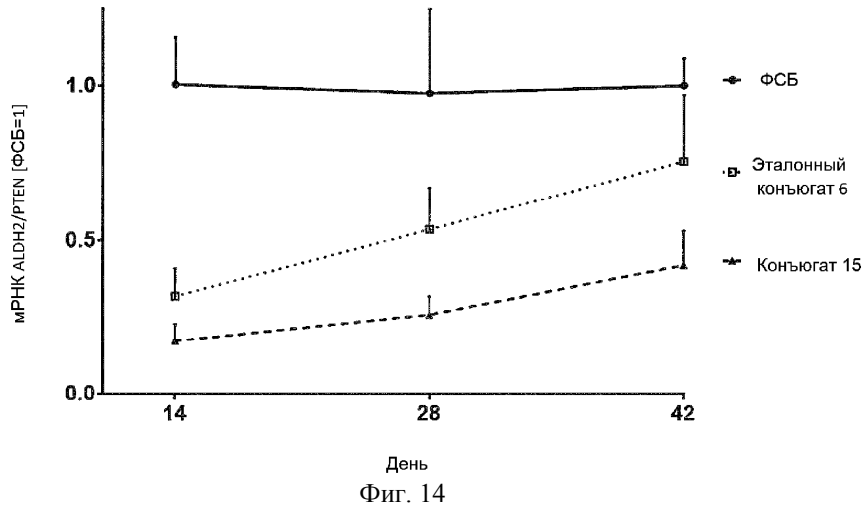


Фиг. 12В



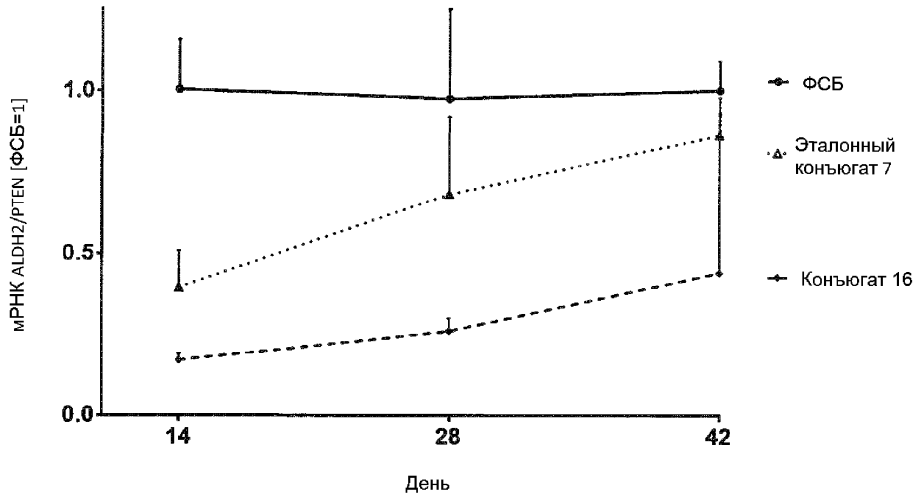
Фиг. 13

Временная динамика уровня транскрипта ALDH2 в печени мышей с57BL/6 после п/к применения указанных GalNac-конъюгатов последовательности миРНК ALDH2-hcm6 (медиана + стандартное отклонение, n=6)



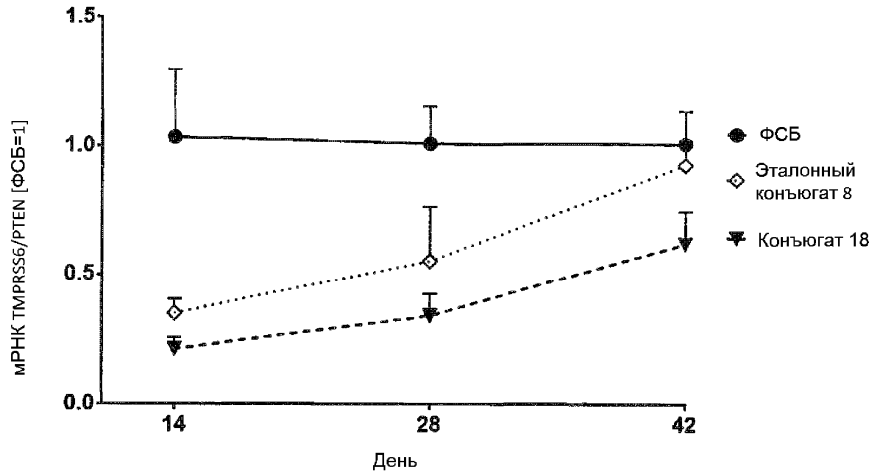
Фиг. 14

Временная динамика уровня транскрипта ALDH2 в печени мышей с57BL/6 после п/к применения указанных GalNac-конъюгатов последовательности миРНК ALDH2-hcm9 (медиана + стандартное отклонение, n=6)

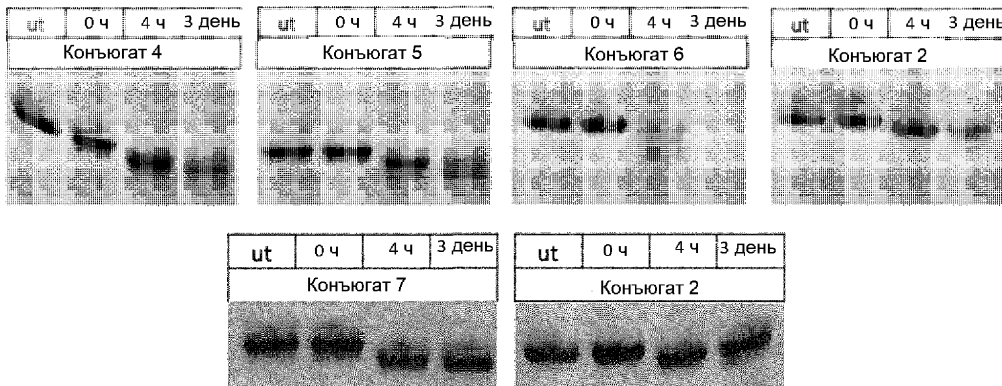


Фиг. 15

Временная динамика уровня транскрипта TMPRSS6 в печени мышей с57BL/6 в указанные моменты времени после п/к применения 1 мг/кг TMPRSS6-hcm9 GalNac-конъюгатов (среднее значение ± стандартное отклонение, n=6)

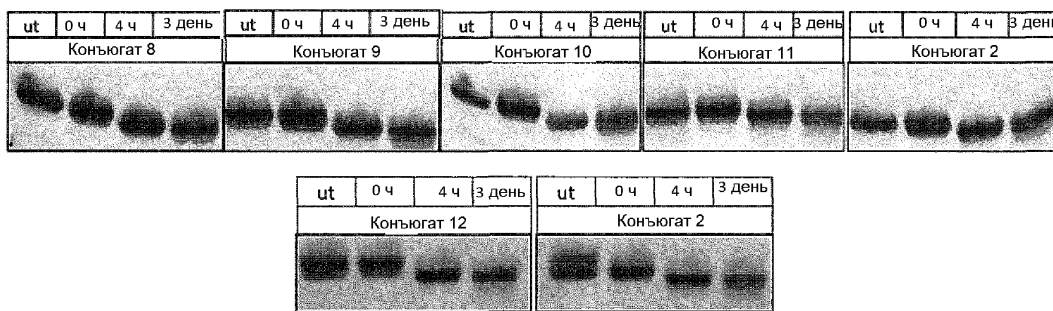


Фиг. 16

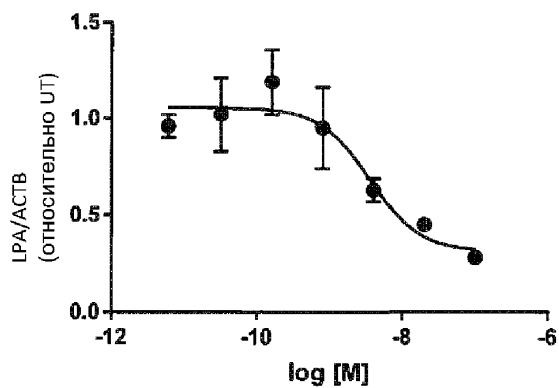


Фиг. 17

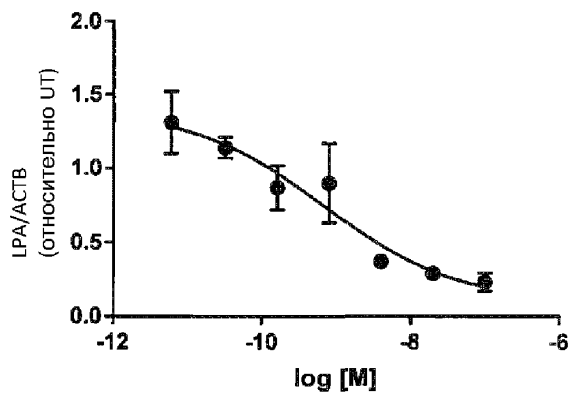




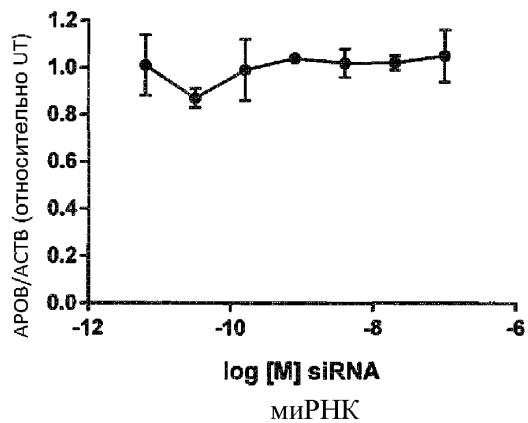
Фиг. 18



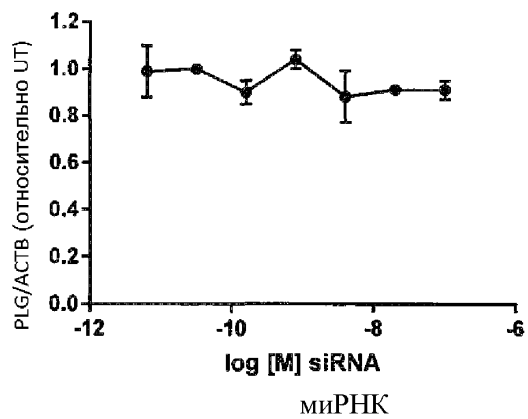
Фиг. 19



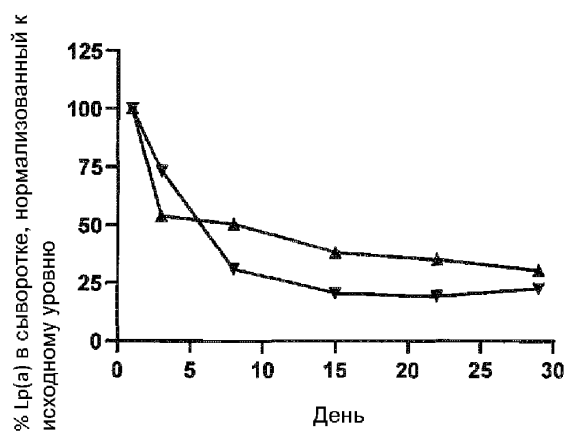
Фиг. 20



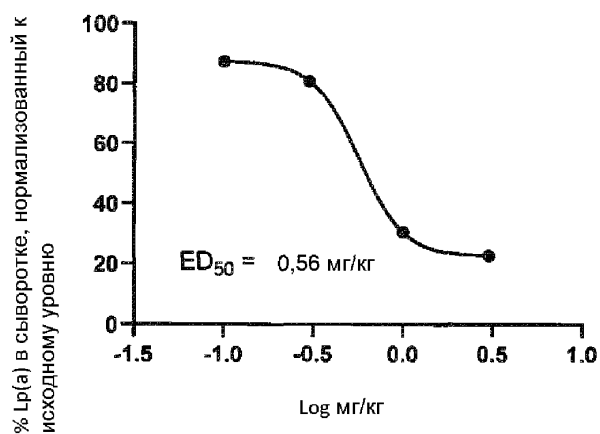
Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24

