

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393486** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.03.11

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.06.22

(54) **ОПТИМИЗИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ АНТИ-FLT1 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПРЕЭКЛАМПСИИ И ДРУГИХ АНГИОГЕННЫХ РАССТРОЙСТВ**

(31) **63/214,224**

(32) **2021.06.23**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/034461**

(87) **WO 2022/271786 2022.12.29**

(71) Заявитель:

**ЮНИВЕРСИТИ ОФ
МАССАЧУСЕТС; БЕТ ИЗРЕЙЭЛ
ДИКОНИСС МЕДИКАЛ СЕНТЕР,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Харихаран Вигнеш Нараян,
Каруманчи Анант, Хворова
Анастасия, Дэвис Сара, Бисканс
Аннабель (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новым мишеням для лечения ангиогенных расстройств. Также предложены новые олигонуклеотиды. Также предложены способы применения новых олигонуклеотидов для лечения ангиогенных расстройств (например, преэклампсии).

202393486
A1

202393486

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580081EA/019

ОПТИМИЗИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ АНТИ-FLT1 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПРЕЭКЛАМПСИИ И ДРУГИХ АНГИОГЕННЫХ РАССТРОЙСТВ

РОДСТВЕННАЯ ЗАЯВКА

[001] Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/214,224, поданной 23 июня 2021 г., полное описание которой включено данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[002] Настоящее изобретение относится к новым ангиогенным мишеням и новым олигонуклеотидным соединениям для лечения ангиогенных расстройств (например, преэклампсии).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[003] Преэклампсия (ПЭ) является серьезным и прогрессирующим фатальным осложнением, встречающимся в 5-8% беременностей во всем мире и приводящим к преждевременным родам, а также к увеличению заболеваемости и смертности как матери, так и плода. ПЭ, характеризующаяся гипертонией и протеинурией, может привести к обширному поражению почек и печени, гемолизу, тромбоцитопении и смерти.

[004] Материнские симптомы ПЭ в первую очередь вызваны высоким уровнем секретируемой плацентой растворимой fms-подобной тирозинкиназы-1 (sFLT1), которая является как диагностическим, так и прогностическим маркером заболевания. Исследования показали, что sFLT1 является перспективной терапевтической мишенью для лечения ПЭ.

[005] В предыдущей работе были определены миРНК, нацеленные на основные изоформы sFLT1, которые снижают плацентарный и циркулирующий уровень sFLT1 у беременных мышей и нечеловекообразных приматов (Turanov et. al. Nat Biotechnol. 2018 Nov 19:10.1038/nbt.4297.). Однако по-прежнему существует необходимость в разработке миРНК, оптимизированных для терапевтического использования у беременных женщин.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[006] Настоящее изобретение частично основано на открытии оптимизированных олигонуклеотидов, которые нацелены на изоформы мРНК, кодирующие белки sFLT1, а не полноразмерный белок FLT1 (fl-FLT1). Новые олигонуклеотиды по изобретению можно использовать для лечения ПЭ, послеродовой ПЭ, эклампсии и/или HELLP-синдрома. Новые олигонуклеотидные последовательности по изобретению (например, малые интерферирующие РНК (миРНК)) были созданы для избирательного снижения уровней sFLT1, без влияния на fl-FLT1, путем связывания с одной или несколькими последовательностями, которые отсутствуют в fl-FLT1, например, с одной или несколькими интронными областями мРНК, кодирующими один или несколько белков sFLT1. Новые оптимизированные олигонуклеотиды (например, миРНК), описанные в данном документе, могут быть предпочтительно доставлены в плацентарные трофобласты

(тип клеток, ответственный за избыточное производство sFLT1) с использованием системной (т.е. внутривенной или подкожной) доставки матери без доставки плоду. В некоторых вариантах осуществления оптимизированные олигонуклеотиды, описанные в данном документе, сохраняют высокий уровень эффективности сайленсинга при повышенном накоплении в плацентарной ткани, снижении накопления в тканях вне мишени, снижении деградации миРНК, снижении токсичности и более широком терапевтическом индексе.

[007] В некоторых аспектах в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), где указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' СТСТCGGATCTCCAAATTТА 3' (SEQ ID NO:1) или 5' САТСАТАGСТАССАТТТАТТ 3' (SEQ ID NO:2); (2) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов; (3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 50% 2'-О-метильных модификаций; (4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16 и 20 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; (5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; и (6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи.

[008] В другом аспекте в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), где указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' СТСТCGGATCTCCAAATTТА 3' (SEQ ID NO:1) или 5' САТСАТАGСТАССАТТТАТТ 3' (SEQ ID NO:2); (2) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов; (3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 50% 2'-О-метильных модификаций; (4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16 и 20 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; (5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи; (7) длина смысловой цепи составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов; (8) смысловая цепь содержит по меньшей мере 65% 2'-О-метильных модификаций; (9) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 4, 6, 8, 10 и 14 от 5'-конца смысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; и (10) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

[009] В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в положениях 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16 и 20 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-

метоксирибонуклеотидами.

[010] В некоторых аспектах в изобретении предложена двухцепочечная РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' СТСТСГГАТСТССААТТТА 3' (SEQ ID NO:1) или 5' САТСАТАГСТАССАТТТАТТ 3' (SEQ ID NO:2); (2) антисмысловая цепь содержит чередующиеся 2'-метоксирибонуклеотиды и 2'-фторрибонуклеотиды; (3) нуклеотиды в положениях 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; (4) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-7 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; и (5) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи.

[011] В другом аспекте в изобретении предложена двухцепочечная РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' СТСТСГГАТСТССААТТТА 3' (SEQ ID NO:1) или 5' САТСАТАГСТАССАТТТАТТ 3' (SEQ ID NO:2); (2) антисмысловая цепь содержит чередующиеся 2'-метоксирибонуклеотиды и 2'-фторрибонуклеотиды; (3) нуклеотиды в положениях 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; (4) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-7 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; и (5) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи; (6) смысловая цепь содержит чередующиеся 2'-метоксирибонуклеотиды и 2'-фторрибонуклеотиды; и (7) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

[012] В некоторых аспектах в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), где указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' СТСТСГГАТСТССААТТТА 3' (SEQ ID NO:1) или 5' САТСАТАГСТАССАТТТАТТ 3' (SEQ ID NO:2); (2) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов; (3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 50% 2'-О-метильных модификаций; (4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16 и 18 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; (5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; и (6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи.

[013] В другом аспекте в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), где указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' СТСТCGGATCTCCAAATTТА 3' (SEQ ID NO:1) или 5' САТСАТАGСТАССАТТТАТТ 3' (SEQ ID NO:2); (2) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов; (3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 50% 2'-О-метильных модификаций; (4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16 и 18 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; (5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи; (7) длина смысловой цепи составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов; (8) смысловая цепь содержит по меньшей мере 80% 2'-О-метильных модификаций; (9) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 7, 9 и 11 от 5'-конца смысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; и (10) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

[014] В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в положениях 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16 и 18 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами.

[015] В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в положениях, 7, 9 и 11 от 5'-конца смысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами.

[016] В некоторых аспектах в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' СТСТCGGATCTCCAAATTТА 3' (SEQ ID NO:1) или 5' САТСАТАGСТАССАТТТАТТ 3' (SEQ ID NO:2); (2) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов; (3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 70% 2'-О-метильных модификаций; (4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2, 4, 5, 6, 8 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; (5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; и (6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи.

[017] В другом аспекте в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности

нуклеиновой кислоты 5' CTCTCGGATCTCCAAATTТА 3' (SEQ ID NO:1) или 5' CATCATAGCTACCATTTATT 3' (SEQ ID NO:2); (2) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов; (3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 70% 2'-О-метильных модификаций; (4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2, 4, 5, 6, 8 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; (5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи; (7) длина смысловой цепи составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов; (8) смысловая цепь содержит 100% 2'-О-метильных модификаций; и (9) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

[018] В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в положениях 2, 4, 5, 6, 8 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами.

[019] В некоторых аспектах в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' CTCTCGGATCTCCAAATTТА 3' (SEQ ID NO:1) или 5' CATCATAGCTACCATTTATT 3' (SEQ ID NO:2); (2) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов; (3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 75% 2'-О-метильных модификаций; (4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2, 4, 5, 6 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; (5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; и (6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи.

[020] В другом аспекте в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' CTCTCGGATCTCCAAATTТА 3' (SEQ ID NO:1) или 5' CATCATAGCTACCATTTATT 3' (SEQ ID NO:2); (2) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов; (3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 75% 2'-О-метильных модификаций; (4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2, 4, 5, 6 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; (5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи; (7) длина смысловой цепи составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов; (8)

смысловая цепь содержит 100% 2'-О-метильных модификаций; и (9) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

[021] В некоторых аспектах в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' СТСТСГГАТСТССААТТТА 3' (SEQ ID NO:1) или 5' САТСАТАГСТАССАТТТАТТ 3' (SEQ ID NO:2); (2) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов; (3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 85% 2'-О-метильных модификаций; (4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; (5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; и (6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи.

[022] В другом аспекте в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' СТСТСГГАТСТССААТТТА 3' (SEQ ID NO:1) или 5' САТСАТАГСТАССАТТТАТТ 3' (SEQ ID NO:2); (2) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов; (3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 85% 2'-О-метильных модификаций; (4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; (5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи; (7) длина смысловой цепи составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов; (8) смысловая цепь содержит 100% 2'-О-метильных модификаций; и (9) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

[023] В некоторых вариантах осуществления длина антисмысловой цепи составляет 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина антисмысловой цепи составляет 21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления длина антисмысловой цепи составляет 22 нуклеотида.

[024] В некоторых вариантах осуществления длина смысловой цепи составляет 15 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина смысловой цепи составляет 16 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина смысловой цепи составляет 18 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина смысловой цепи составляет 20

нуклеотидов.

[025] В некоторых вариантах осуществления дцРНК содержит двухцепочечную область длиной от 15 до 20 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления дцРНК содержит двухцепочечную область из 15 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления дцРНК содержит двухцепочечную область из 16 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления дцРНК содержит двухцепочечную область из 18 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления дцРНК содержит двухцепочечную область из 20 пар оснований.

[026] В некоторых вариантах осуществления дцРНК имеет тупой конец.

[027] В некоторых вариантах осуществления дцРНК содержит по меньшей мере один выступающий одноцепочечный нуклеотид.

[028] В некоторых вариантах осуществления дцРНК содержит от около 2 до 5 нуклеотидов в выступающем одноцепочечном нуклеотиде.

[029] В некоторых вариантах осуществления дцРНК содержит 4-16 фосфотиоатных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления дцРНК содержит 8-13 фосфотиоатных межнуклеотидных связей.

[030] В некоторых вариантах осуществления изобретения смысловая цепь включает одно или несколько нуклеотидных несоответствий между антисмысловой цепью и смысловой цепью.

[031] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит 5'-фосфат, 5'-алкилфосфонат, 5'-алкиленфосфонат или 5'-алкенилфосфонат.

[032] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит 5'-винилфосфонат.

[033] В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент связан с 3'-концом смысловой цепи.

[034] В некоторых вариантах осуществления функциональный Фрагмент содержит гидрофобный фрагмент.

[035] В некоторых вариантах осуществления гидрофобный фрагмент выбран из группы, состоящей из жирных кислот, стероидов, секостероидов, липидов, ганглиозидов, аналогов нуклеозидов, эндоканнабиноидов, витаминов и их смесей.

[036] В некоторых вариантах осуществления стероид выбран из группы, состоящей из холестерина и литохоловой кислоты (LCA).

[037] В некоторых вариантах осуществления жирная кислота выбрана из группы, состоящей из эйкозапентаеновой кислоты (EPA), докозагексаеновой кислоты (DHA) и докозановой кислоты (DCA). В некоторых вариантах осуществления жирная кислота представляет собой EPA. В некоторых вариантах осуществления жирная кислота представляет собой DHA. В некоторых вариантах осуществления жирная кислота представляет собой DCA. В некоторых вариантах осуществления жирная кислота представляет собой PC- DCA.

[038] В некоторых вариантах осуществления витамин выбран из группы,

состоящей из холина, витамина А, витамина Е и их производных или метаболитов.

[039] В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент связан со смысловой цепью с помощью линкера.

[040] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер.

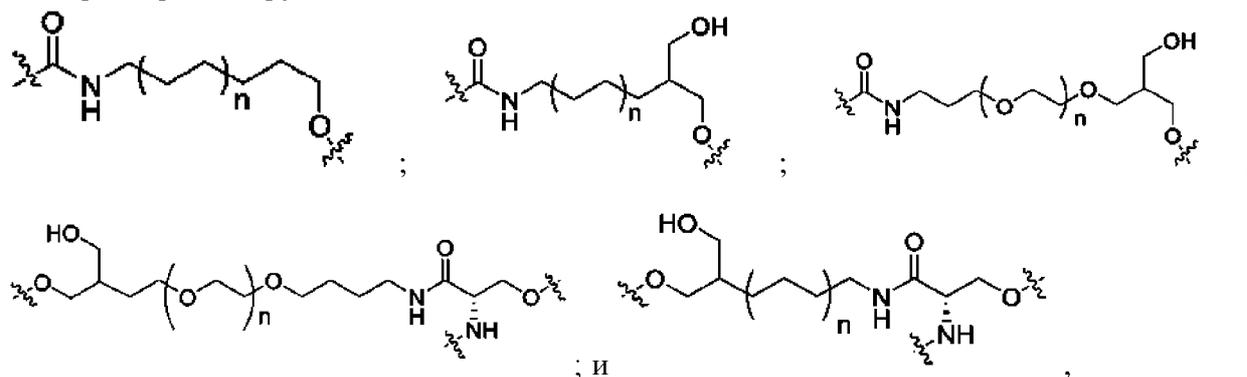
[041] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит фосфодиэфирную связь, дисульфидную связь, кислотолабильную связь или фоторасщепляемую связь.

[042] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает динуклеотид dTdT с фосфодиэфирными межнуклеотидными связями.

[043] В некоторых вариантах осуществления кислотно-лабильная связь включает β -тиопропионатную связь или связь карбоксидиметилмалеинового ангидрида (СDM).

[044] В некоторых вариантах осуществления линкер включает двухвалентный или трехвалентный линкер.

[045] В некоторых вариантах осуществления двухвалентный или трехвалентный линкер выбран из группы, состоящей из:



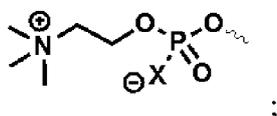
где n равно 1, 2, 3, 4 или 5.

[046] В некоторых вариантах осуществления линкер содержит цепь этиленгликоля, алкильную цепь, пептид, РНК, ДНК, фосфодиэфир, тиофосфат, фосфорамидат, амид, карбамат или их комбинацию.

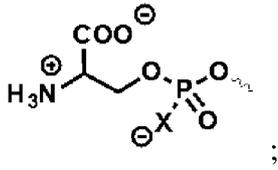
[047] В некоторых вариантах осуществления, когда линкер представляет собой трехвалентный линкер, линкер дополнительно связывает фосфодиэфир или производное фосфодиэфира.

[048] В некоторых вариантах осуществления линкер дополнительно связывает фосфодиэфир или производное фосфодиэфира.

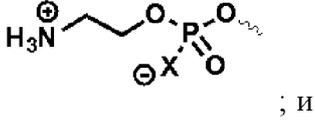
[049] В некоторых вариантах осуществления фосфодиэфир или производное фосфодиэфира выбрано из группы, состоящей из:



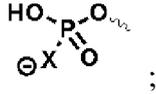
(Zc1);



(Zc2);



(Zc3)



(Zc4)

где X представляет собой O, S или BH_3 .

[050] В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в положениях 1 и 2 от 3'-конца смысловой цепи и нуклеотиды в положениях 1 и 2 от 5'-конца антисмысловой цепи соединены с соседними рибонуклеотидами посредством фосфоротиоатных связей.

[051] В некоторых вариантах осуществления область комплементарности комплементарна по меньшей мере 15, 16, 17 или 18 смежным нуклеотидам SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

[052] В некоторых вариантах осуществления область комплементарности содержит не более 3 несоответствий с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

[053] В некоторых вариантах осуществления область комплементарности полностью комплементарна SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

[054] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты 5' UAAAUUUGGAGAUCCGAGAGA 3', а смысловая цепь содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты 5' CGGAUCUCCAAAUUUA 3'.

[055] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты 5' UAUAAAUGGUAGCUAUGAUGA 3', а смысловая цепь содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты 5' AUAGCUACCAUUUAUA 3'.

[056] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложена соль молекулы дцРНК. В некоторых вариантах осуществления соль включает натриевую соль или калиевую соль. В некоторых вариантах осуществления соль включает фармацевтически приемлемую соль.

[057] В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка sFLT1 в клетке или организме снижается по меньшей мере на около 20%.

[058] В одном аспекте в изобретении предложен способ лечения или контроля ПЭ, послеродовой ПЭ, эклампсии или синдрома HELLP, включающий введение субъекту,

нуждающемся в таком лечении или контроле, терапевтически эффективного количества дцРНК, описанной выше.

[059] В некоторых аспектах в изобретении предложен способ лечения или контроля ПЭ, включающий введение субъекту, нуждающемся в таком лечении или контроле, терапевтически эффективного количества дцРНК, описанной выше.

[060] В некоторых аспектах в изобретении предложен способ лечения или контроля послеродовой ПЭ, включающий введение субъекту, нуждающемся в таком лечении или контроле, терапевтически эффективного количества дцРНК, описанной выше.

[061] В некоторых аспектах в изобретении предложен способ лечения или контроля эклампсии, включающий введение субъекту, нуждающемся в таком лечении или контроле, терапевтически эффективного количества дцРНК, описанной выше.

[062] В некоторых аспектах в изобретении предложен способ лечения или контроля HELLP-синдрома, включающий введение субъекту, нуждающемся в таком лечении или контроле, терапевтически эффективного количества дцРНК, описанной выше.

[063] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят внутривенно или подкожно.

[064] В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка sFLT1 снижается у субъекта по меньшей мере на около 20%.

[065] В одном аспекте в изобретении предложен способ лечения одного или нескольких симптомов ПЭ, послеродовой ПЭ, эклампсии или синдрома HELLP у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту дцРНК, описанной выше.

[066] В одном аспекте в изобретении предложен способ лечения одного или нескольких симптомов ангиогенного расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту дцРНК, описанной выше.

[067] В некоторых вариантах осуществления ангиогенное расстройство выбрано из группы, состоящей из ПЭ, послеродовой ПЭ, эклампсии и HELLP-синдрома.

[068] В одном аспекте в изобретении предложена фармацевтическая композиция, включающая: первую дцРНК, содержащую первую смысловую цепь и первую антисмысловую цепь, причем первая антисмысловая цепь содержит область комплементарности, которая по существу комплементарна SEQ ID NO: 1, при этом первая антисмысловая цепь дсРНК содержит дсРНК, описанную выше; вторую дцРНК, содержащую вторую смысловую цепь и вторую антисмысловую цепь, при этом вторая антисмысловая цепь содержит область комплементарности, которая по существу комплементарна SEQ ID NO: 2, при этом вторая дцРНК содержит дцРНК, описанную выше; и фармацевтически приемлемый носитель.

[069] В одном аспекте в изобретении предложена фармацевтическая композиция, включающая: первую дцРНК, содержащую первую смысловую цепь и первую антисмысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом первая антисмысловая цепь содержит область комплементарности, которая по существу

комплементарна SEQ ID NO: 1; вторую дцРНК, содержащую вторую смысловую цепь и вторую антисмысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом вторая антисмысловая цепь содержит область комплементарности, которая по существу комплементарна SEQ ID NO: 2; и фармацевтически приемлемый носитель, где для каждой из первой дцРНК и второй дцРНК: (1) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов; (3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 50% 2'-О-метильных модификаций; (4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16 и 20 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; (5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи; (7) длина смысловой цепи составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов; (8) смысловая цепь содержит по меньшей мере 65% 2'-О-метильных модификаций; (9) нуклеотиды в любом или нескольких из положений 4, 6, 8, 10 и 14 от 5'-конца смысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; и (10) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

[070] В некоторых аспектах в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит (mU)#(fA)#(mA)(fA)(fU)(fU)(mU)(fG)(mG)(fA)(mG)(fA)(mU)(fC)#(mC)#(fG)#(mA)#(mG)#(mA)#(fG)#(mA); и (2) смысловая цепь содержит (mC)#(mG)#(mG)(fA)(mU)(fC)(mU)(fC)(mC)(fA)(mA)(mA)(mU)(fU)#(mU)#(mA), где «m» соответствует 2'-О-метил модификации, «f» соответствует 2'-фтор модификации, «#» соответствует тиофосфатной межнуклеотидной связи.

[071] В некоторых аспектах в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: антисмысловая цепь содержит (mU)#(fA)#(mA)(fA)(fU)(fU)(mU)(fG)(mG)(fA)(mG)(fA)(mU)(fC)#(mC)#(fG)#(mA)#(mG)#(mA)#(fG)#(mA), где «m» соответствует 2'-О-метил модификации, «f» соответствует 2'-фтор модификации, «#» соответствует тиофосфатной межнуклеотидной связи.

[072] В некоторых аспектах в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: смысловая цепь содержит (mC)#(mG)#(mG)(fA)(mU)(fC)(mU)(fC)(mC)(fA)(mA)(mA)(mU)(fU)#(mU)#(mA), где «m» соответствует 2'-О-метил модификации, «f» соответствует 2'-фтор модификации, «#» соответствует тиофосфатной межнуклеотидной связи.

[073] В некоторых аспектах в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую

цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит

(mU)#(fA)#(mU)(fA)(fA)(fA)(mU)(fG)(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fU)#(mA)#(fU)#(mG)#(mA)#(mU)#(fG)#(mA); and (2) the sense strand comprises (mA)#(mU)#(mA)(fG)(mC)(fU)(mA)(fC)(mC)(fA)(mU)(mU)(mU)(fA)#(mU)#(mA), где «m» соответствует 2'-О-метил модификации, «f» соответствует 2'-фтор модификации, «#» соответствует тиофосфатной межнуклеотидной связи.

[074] В некоторых аспектах в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: антисмысловая цепь содержит

(mU)#(fA)#(mU)(fA)(fA)(fA)(mU)(fG)(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fU)#(mA)#(fU)#(mG)#(mA)#(mU)#(fG)#(mA), где «m» соответствует 2'-О-метил модификации, «f» соответствует 2'-фтор модификации, «#» соответствует тиофосфатной межнуклеотидной связи.

[075] В некоторых аспектах в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: смысловая цепь содержит (mA)#(mU)#(mA)(fG)(mC)(fU)(mA)(fC)(mC)(fA)(mU)(mU)(mU)(fA)#(mU)#(mA), где «m» соответствует 2'-О-метил модификации, «f» соответствует 2'-фтор модификации, «#» соответствует тиофосфатной межнуклеотидной связи.

[076] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит 5'-винилфосфонат.

[077] В некоторых вариантах осуществления дцРНК содержит конъюгат докозановой кислоты (DCA), связанный с 3'-концом смысловой цепи.

[078] В некоторых вариантах осуществления DCA связан со смысловой цепью с помощью линкера.

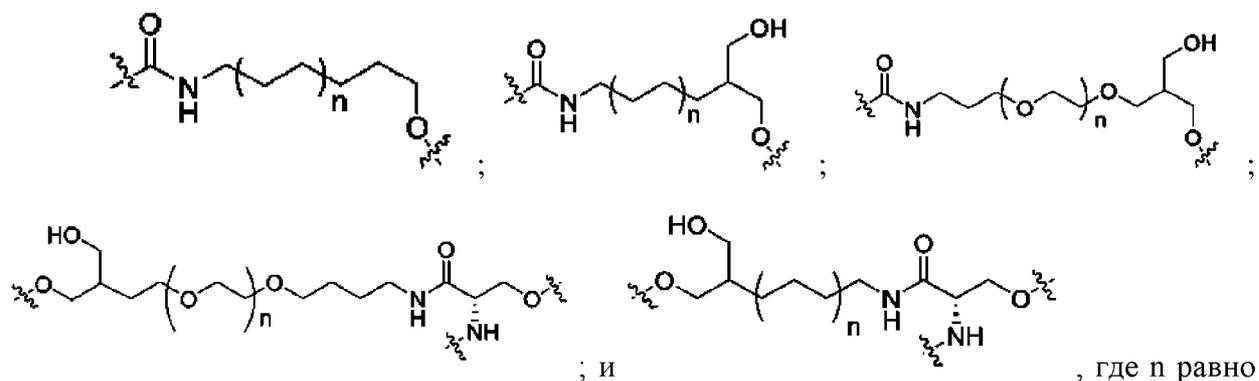
[079] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер.

[080] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит фосфодиэфирную связь, дисульфидную связь, кислотолабильную связь или фоторасщепляемую связь.

[081] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит динуклеотид dTdT с фосфодиэфирными межнуклеотидными связями.

[082] В некоторых вариантах осуществления линкер включает двухвалентный или трехвалентный линкер.

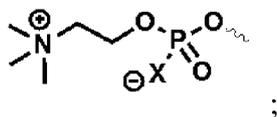
[083] В некоторых вариантах осуществления двухвалентный или трехвалентный линкер выбран из группы, состоящей из:



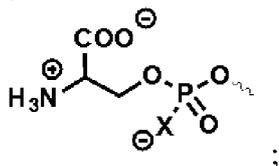
1, 2, 3, 4 или 5.

[084] В некоторых вариантах осуществления, когда линкер представляет собой трехвалентный линкер, линкер дополнительно связывает фосфодиэфир или производное фосфодиэфира.

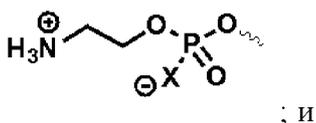
[085] В некоторых вариантах осуществления фосфодиэфир или производное фосфодиэфира выбрано из группы, состоящей из:



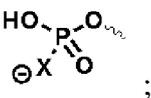
(Zc1);



(Zc2);



(Zc3)



(Zc4)

где X представляет собой O, S или NH₃.

[086] В некоторых аспектах в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит

V(mU)#(fA)#(mA)(fA)(fU)(fU)(mU)(fG)(mG)(fA)(mG)(fA)(mU)(fC)#(mC)#(fG)#(mA)#(mГ)#(mA)#(fG)#(mA); и (2) смысловая цепь содержит

(mC)#(mG)#(mG)(fA)(mU)(fC)(mU)(fC)(mC)(fA)(mA)(mA)(mU)(fU)#(mU)#(mA)(T)(T)-PCDCA, где «m» соответствует 2'-О-метил модификации, «f» соответствует 2'-фтор

модификации, «Т» соответствует тимидиновому нуклеотиду ДНК, «#» соответствует тиофосфатной межнуклеотидной связи, «V» соответствует 5'-винилфосфонату, а «PCDSA» соответствует 3'-С7-фосфохолин-докозановой кислоте, конъюгированной через фосфатный линкер.

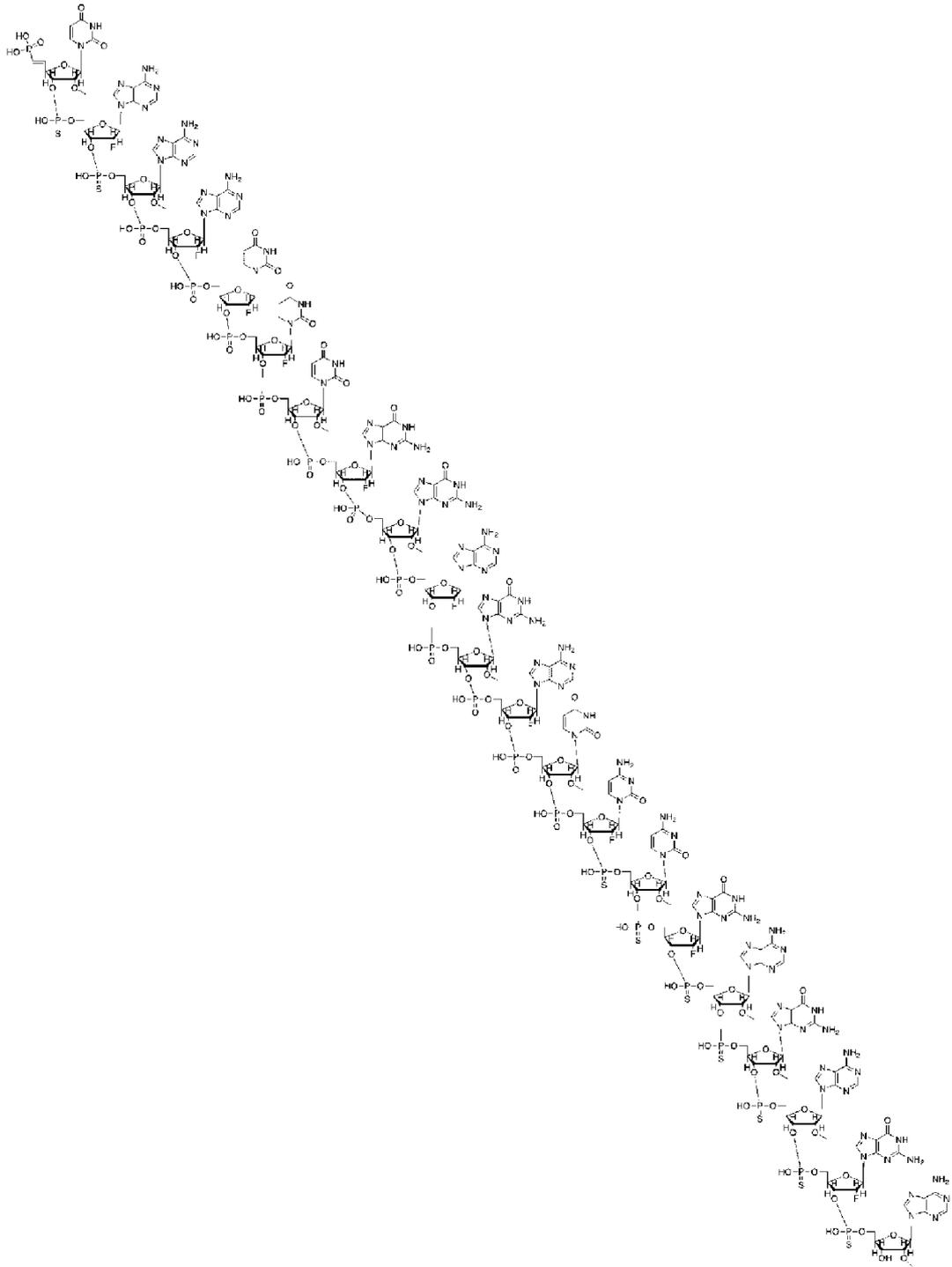
[087] В некоторых аспектах в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит

V(mU)#(fA)#(mU)(fA)(fA)(fA)(mU)(fG)(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fU)#(mA)#(fU)#(mG)#(mA)#(mU)#(fG)#(mA); and (2) the sense strand comprises (mA)#(mU)#(mA)(fG)(mC)(fU)(mA)(fC)(mC)(fA)(mU)(mU)(mU)(fA)#(mU)#(mA)(T)(T)-PCDSA, где «m» соответствует 2'-О-метил модификации, «f» соответствует 2'-фтор модификации, «Т» соответствует тимидиновому нуклеотиду ДНК, «#» соответствует тиофосфатной межнуклеотидной связи, «V» соответствует 5'-винилфосфонату, а «PCDSA» соответствует 3'-С7-фосфохолин-докозановой кислоте, конъюгированной через фосфатный линкер.

[088] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложена соль молекулы дцРНК. В некоторых вариантах осуществления соль включает натриевую соль или калиевую соль. В некоторых вариантах осуществления соль включает фармацевтически приемлемую соль.

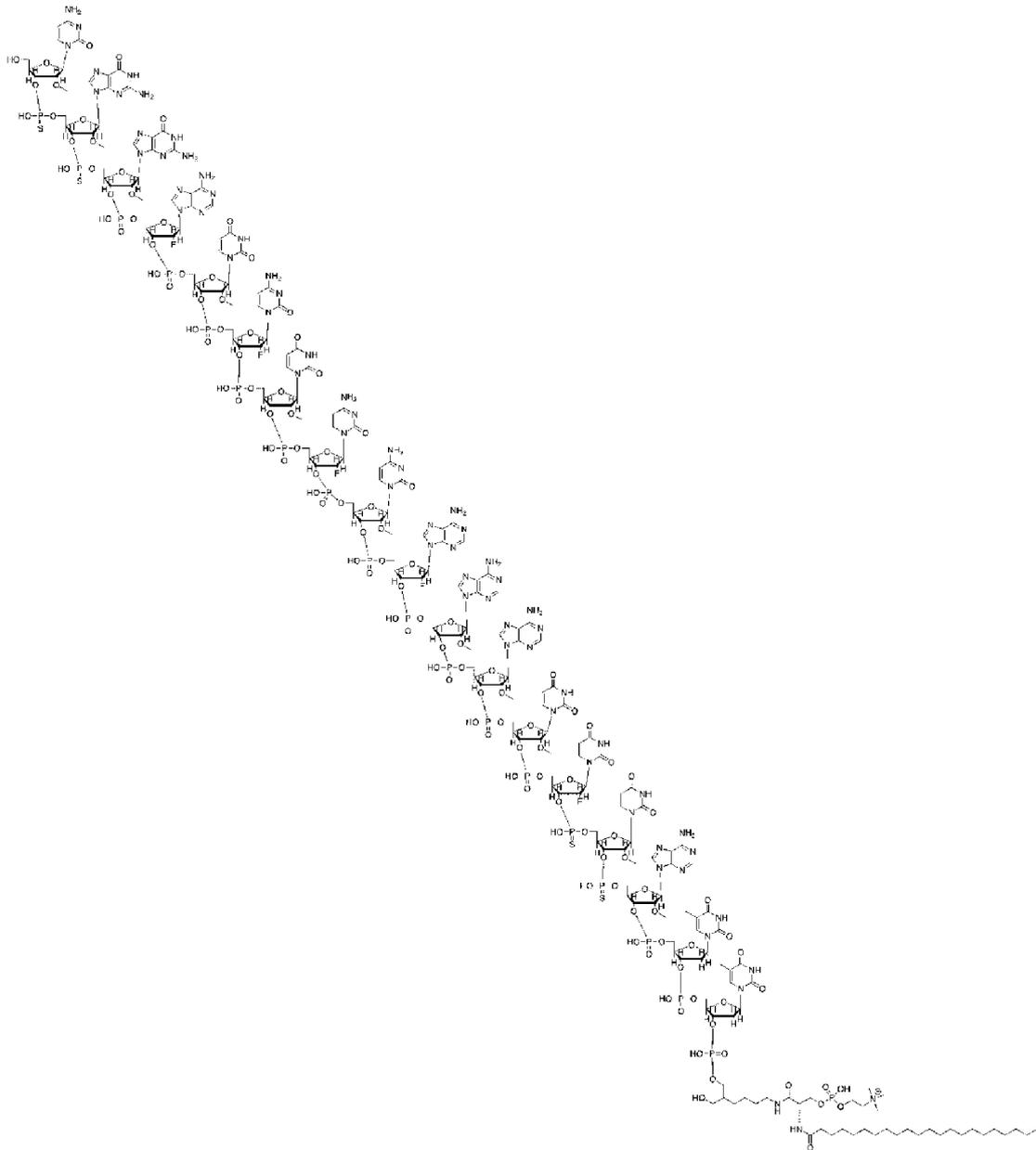
[089] В некоторых аспектах в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

(1) антисмысловая цепь включает формулу I или ее соль:



Формула I; и

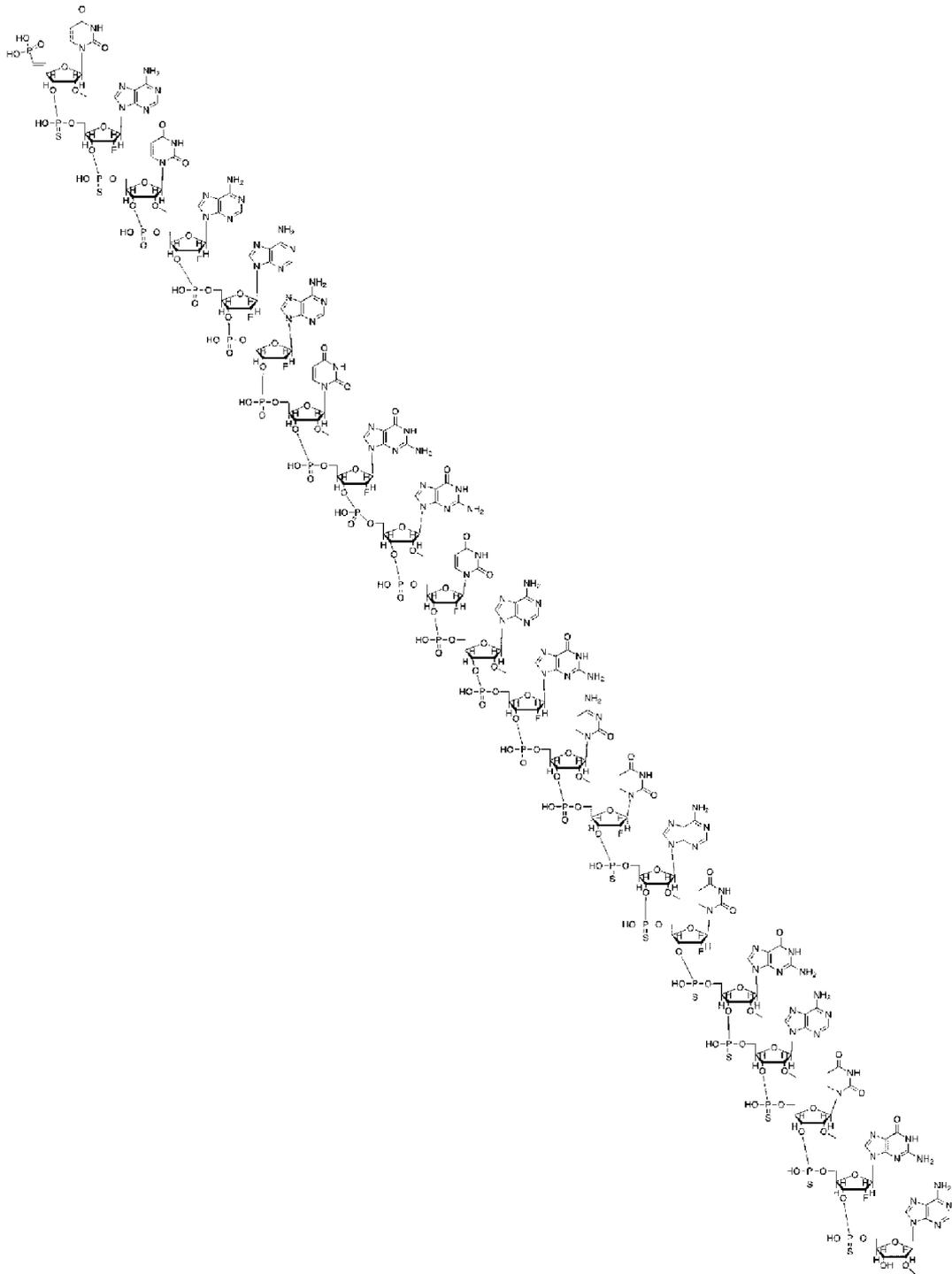
(2) смысловая цепь включает формулу II или ее соль:



Формула II.

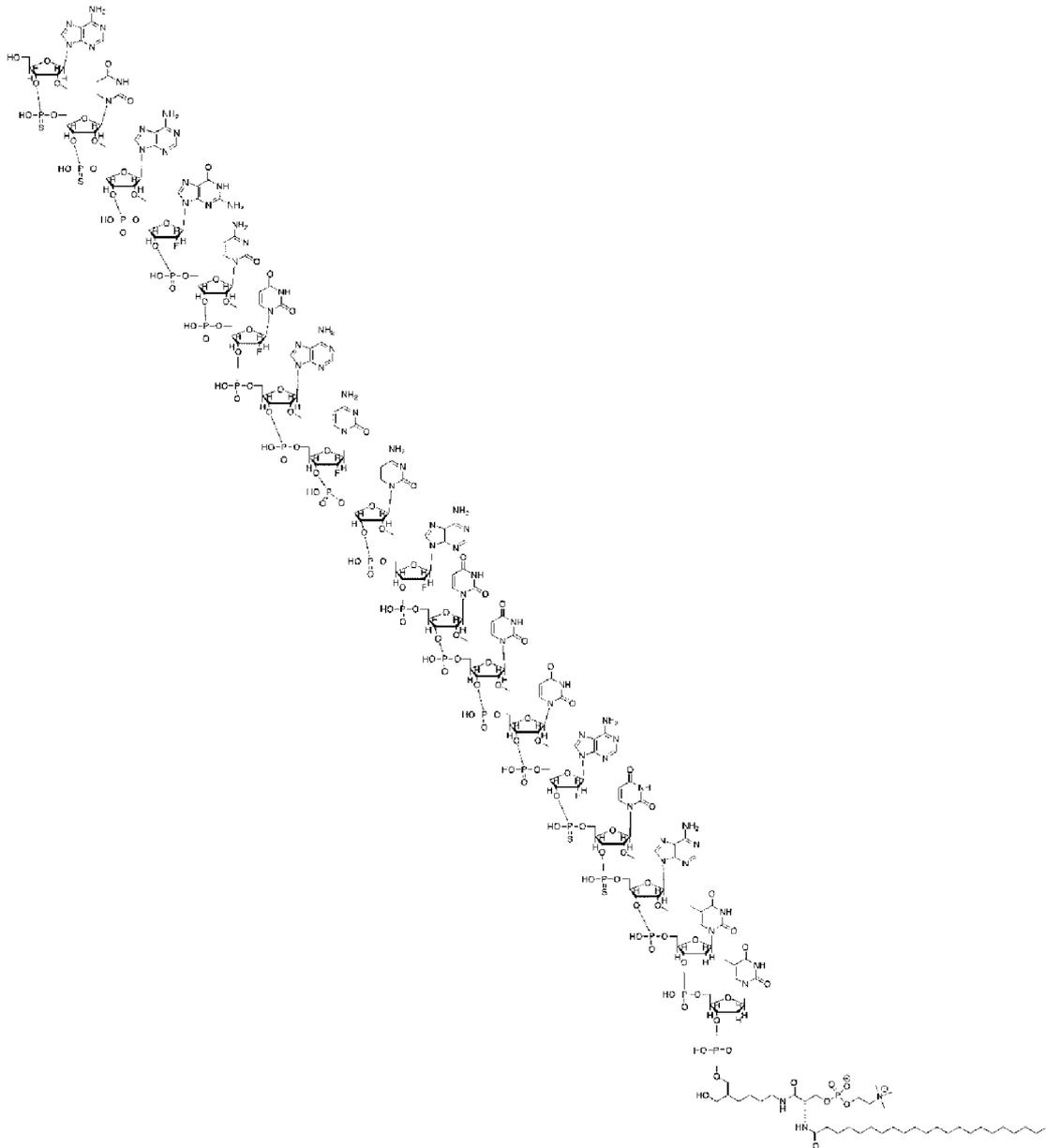
[090] В некоторых аспектах в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

(1) антисмысловая цепь включает формулу III или ее соль:



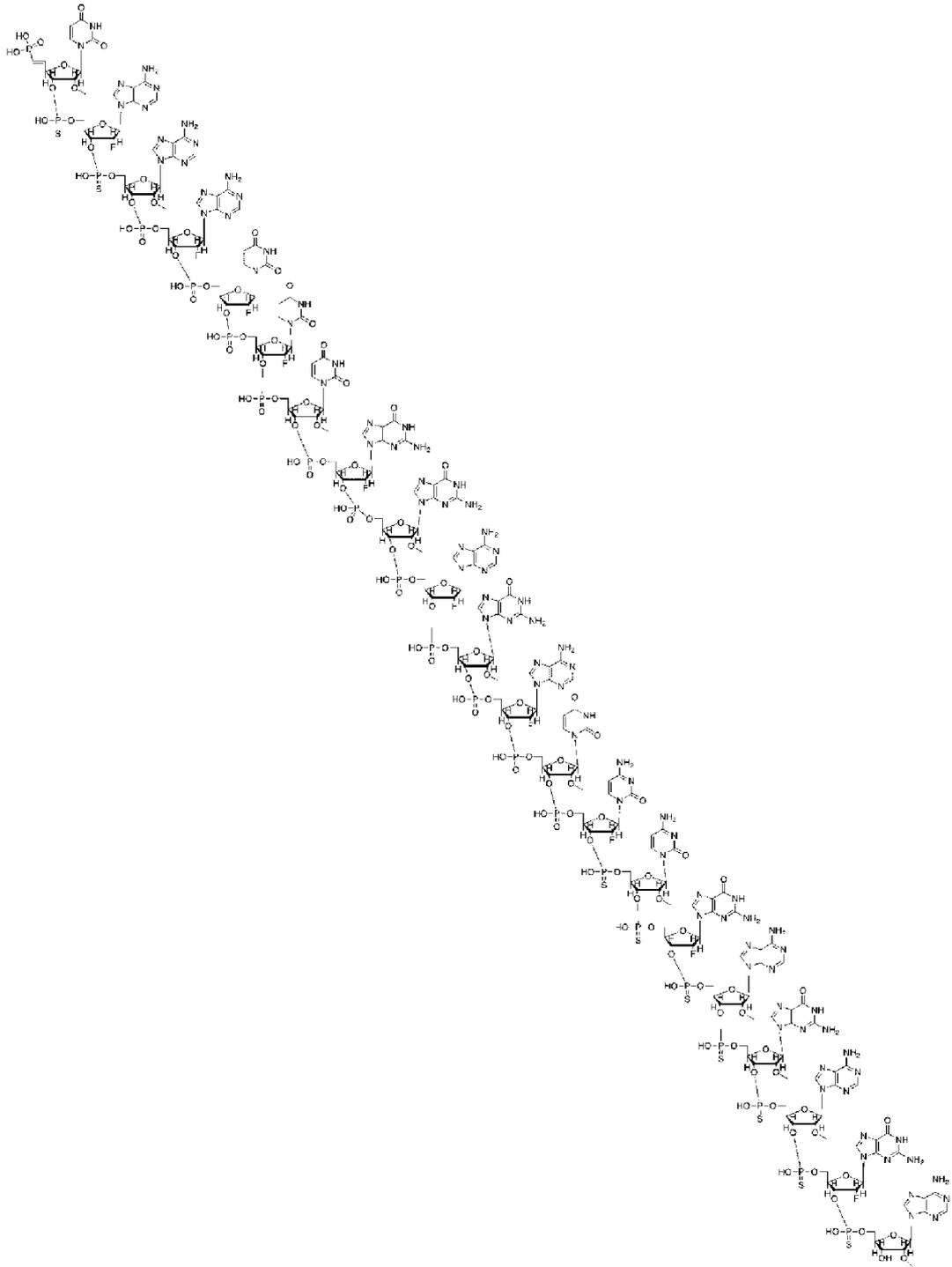
Формула III; и

(2) смысловая цепь включает формулу IV или ее соль:



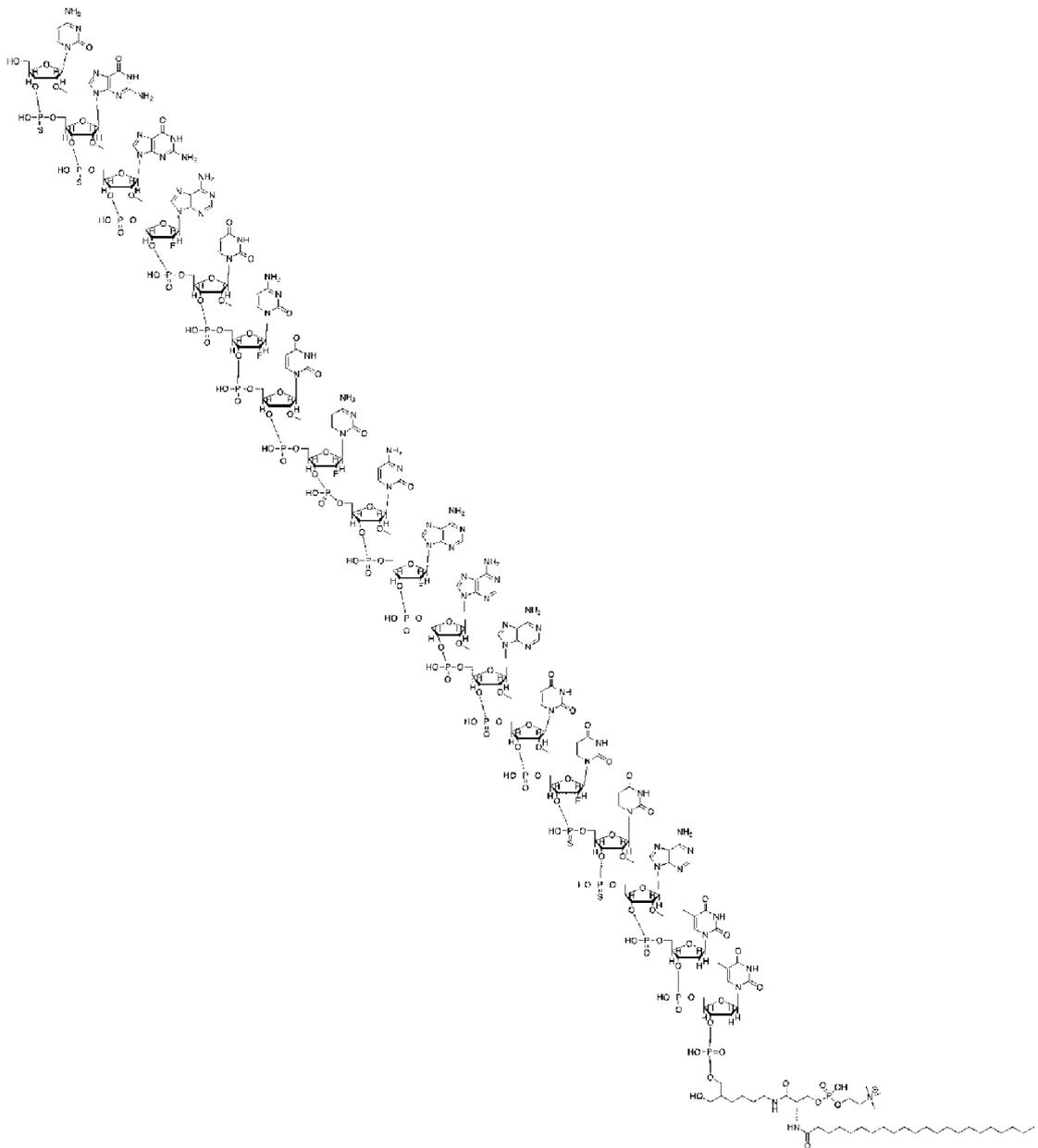
Формула IV.

В некоторых аспектах в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом антисмысловая цепь включает формулу I или ее соль:



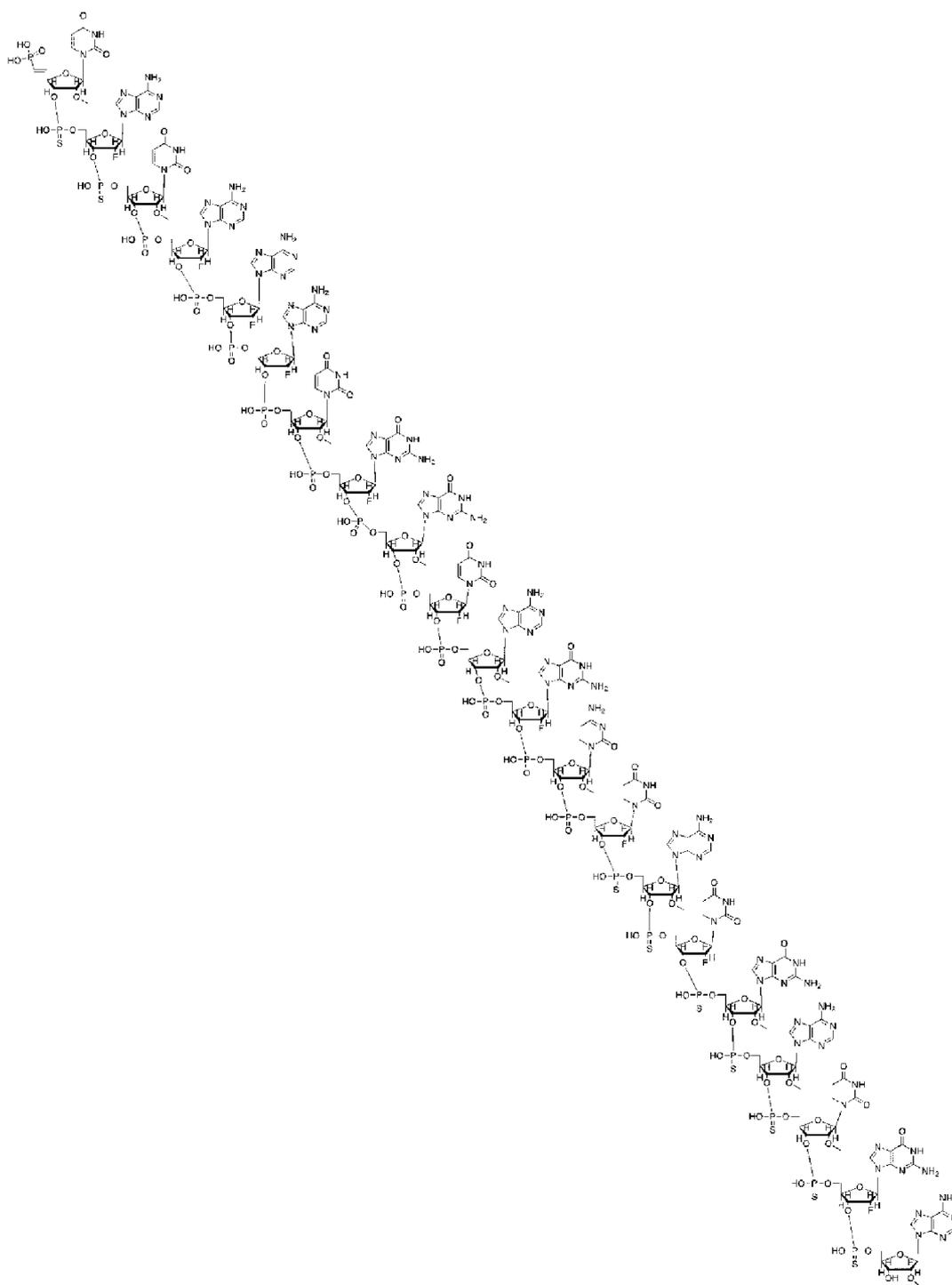
Формула I

В некоторых аспектах в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом смысловая цепь включает формулу II или ее соль:



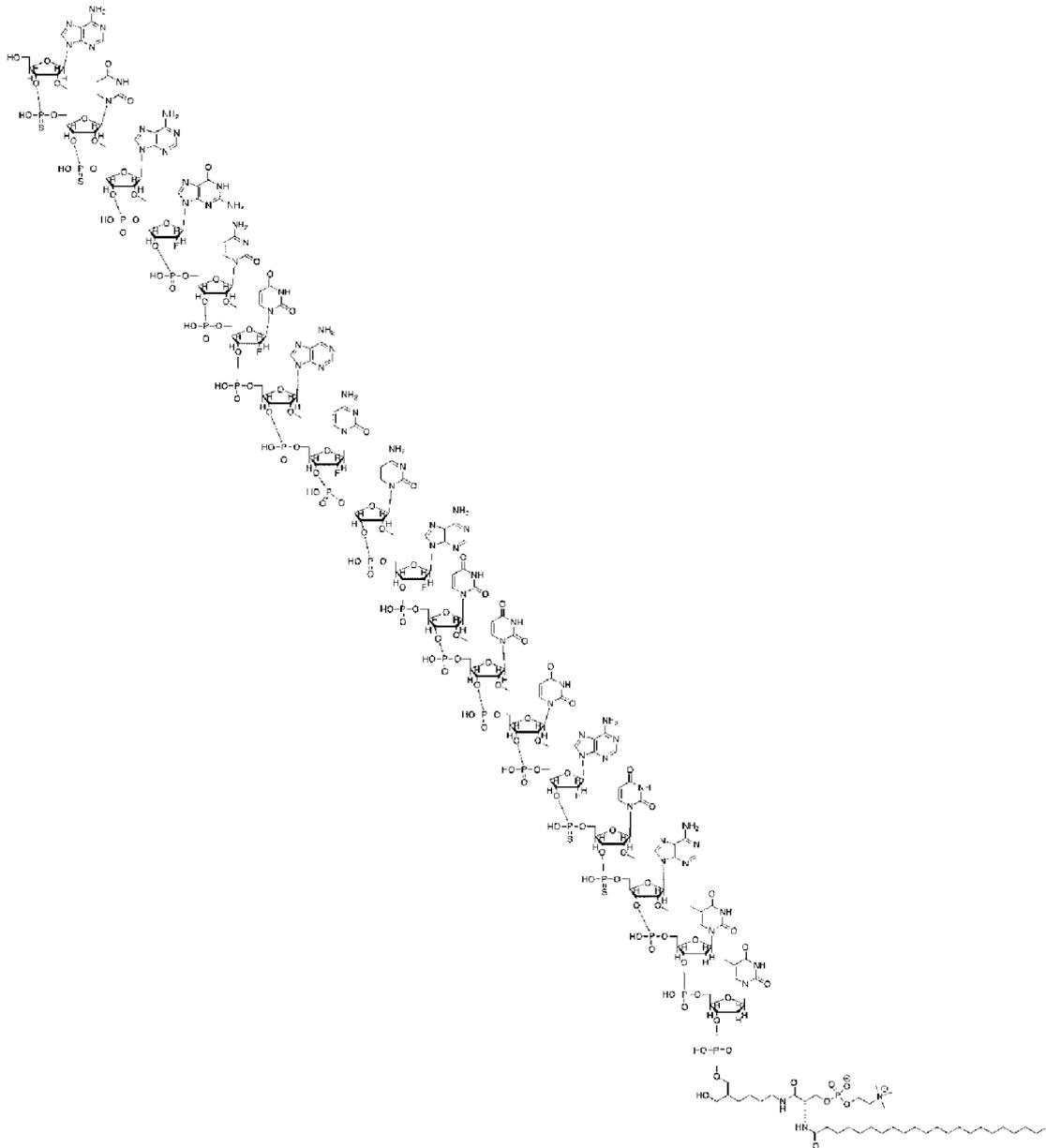
Формула II.

В некоторых аспектах в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом антисмысловая цепь включает формулу III ее соль:



Формула III

В некоторых аспектах в изобретении предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом смысловая цепь включает формулу IV или ее соль:



Формула IV.

[091] В некоторых вариантах осуществления соль включает фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления соль включает натриевую соль или калиевую соль.

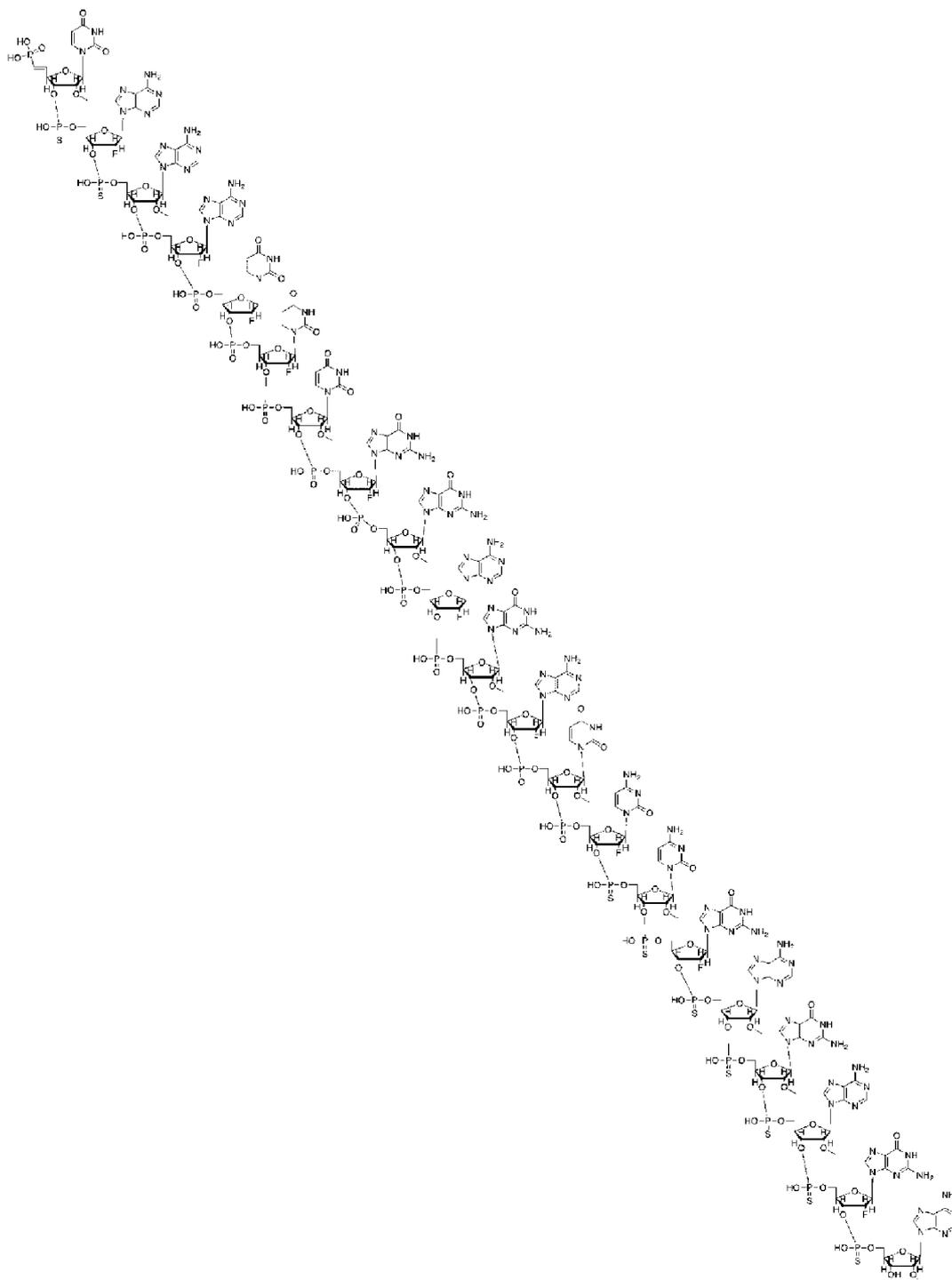
[092] В некоторых аспектах в изобретении предложен способ лечения или контроля ПЭ, послеродовой ПЭ, эклампсии или синдрома HELLP, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении или контроле, терапевтически эффективного количества дцРНК, описанной выше.

[093] В некоторых аспектах в изобретении предложена фармацевтическая композиция, включающая: первую дцРНК, причем указанная первая дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит V(mU)#(fA)#(mA)(fA)(fU)(fU)(mU)(fG)(mG)(fA)(mG)(fA)(mU)(fC)#(mC)#(fG)#(mA)#(mГ)#(mA)#(fG)#(mA); и (2) смысловая цепь содержит

(mC)#(mG)#(mG)(fA)(mU)(fC)(mU)(fC)(mC)(fA)(mA)(mA)(mU)(fU)#(mU)#(mA)(T)(T)-PCDSA; и вторую дцРНК, причем указанная вторая дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит V(mU)#(fA)#(mU)(fA)(fA)(fA)(mU)(fG)(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fU)#(mA)#(fU)#(mG)#(mA)#(mE)#(fG)#(mA); и (2) смысловая цепь содержит (mA)#(mU)#(mA)(fG)(mC)(fU)(mA)(fC)(mC)(fA)(mU)(mU)(mU)(fA)#(mU)#(mA)(T)(T)-PCDSA, где «m» соответствует 2'-О-метил модификации, «f» соответствует 2'-фтор модификации, «Т» соответствует тимидиновому нуклеотиду ДНК, «#» соответствует тиофосфатной межнуклеотидной связи, «V» соответствует 5'-винилфосфонату, а «PCDSA» соответствует 3'-С7-фосфохолин-докозановой кислоте, конъюгированной через фосфатный линкер.

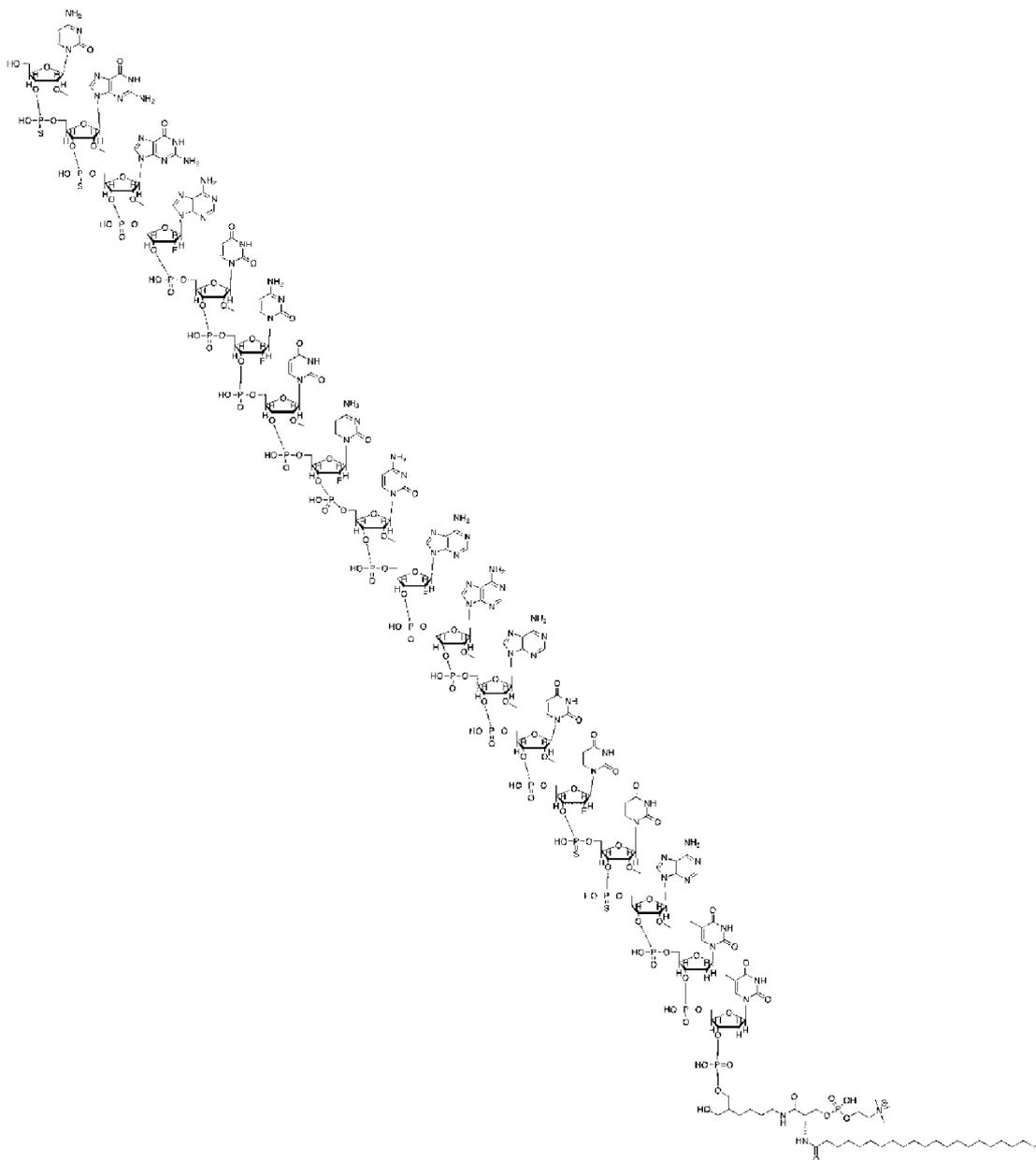
[094] В некоторых аспектах в изобретении предложена фармацевтическая композиция, включающая первую дцРНК, причем указанная первая дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

(1) антисмысловая цепь включает формулу I или ее соль:



Формула I; и

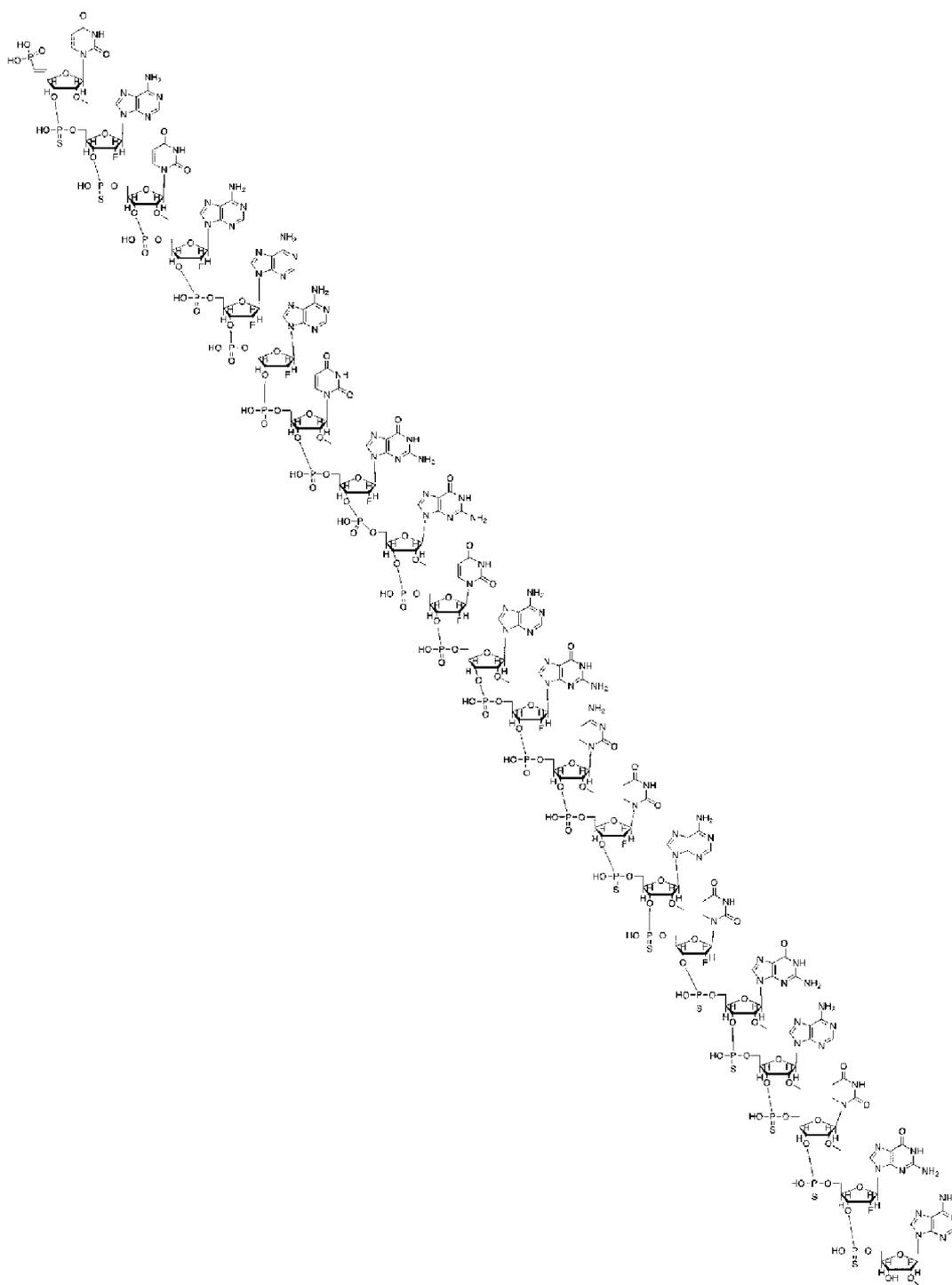
(2) смысловая цепь включает формулу II или ее соль:



Формула II; и

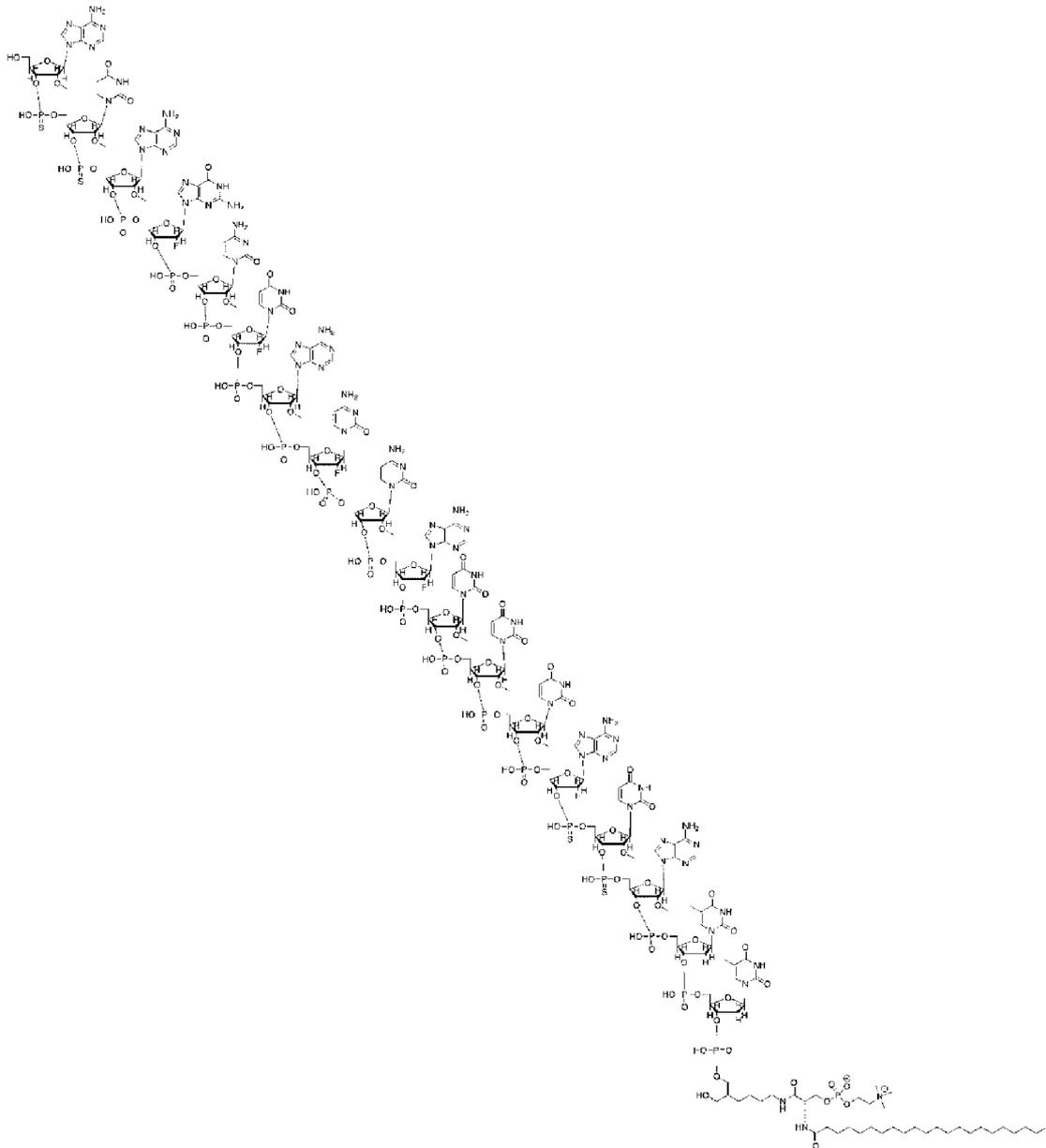
вторую дцРНК, причем указанная вторая дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, где каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

(1) антисмысловая цепь включает формулу III или ее соль:



Формула III; и

(2) смысловая цепь включает формулу IV или ее соль:



Формула IV.

[095] В некоторых вариантах осуществления соль включает фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления соль включает натриевую соль или калиевую соль.

[096] В некоторых аспектах в изобретении предложен способ лечения или контроля ПЭ, послеродовой ПЭ, эклампсии или синдрома HELLP, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении или контроле, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, описанной выше. В некоторых аспектах в изобретении предложен способ лечения или контроля ПЭ, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении или контроле, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, описанной выше. В некоторых аспектах в изобретении предложен способ лечения или контроля послеродовой ПЭ, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении или контроле, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, описанной выше. В некоторых аспектах в

изобретении предложен способ лечения или контроля эклампсии, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении или контроле, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, описанной выше. В некоторых аспектах в изобретении предложен способ лечения или контроля синдрома HELLP, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении или контроле, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, описанной выше.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[097] Вышеупомянутые и другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут более понятными из следующего подробного описания иллюстративных вариантов осуществления в сочетании с прилагаемыми графическими материалами. Данный патент или комплект материалов заявки содержит по меньшей мере один графический материал, выполненный в цвете. Копии этого патента или этой публикации заявки на патент с цветным графическим(и) материалом(ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и после уплаты необходимой пошлины.

[098] *На фиг. 1А - фиг. 1В* представлена эффективность сайленсинга нескольких образцов химических модификаций миРНК, богатых 2'ОМе. На фиг. 1А изображены схемы образцов химических модификаций миРНК, богатых 2'ОМе. На фиг. 1В представлены кривые зависимости «доза-ответ» и сводная таблица миРНК, нацеленных на *flt1* человека. Клетки HeLa, обработанные миРНК в указанных концентрациях, в течение 72 часов. Уровни мРНК измеряли с помощью системы Dual-Glo® Luciferase Assay System и рассчитывали как процент от необработанного контроля (С). Таблица фиг. 1В - Макс. KD (%) - максимальный процент нокдауна мРНК-мишени при максимальной лечебной дозе миРНК, IC50 - половина максимальной ингибирующей концентрации, AUC - площадь под кривой доза-ответ, величина *p* - значимость.

[099] *На фиг. 2А - фиг. 2В* представлены флуоресцентные изображения тканей и накопление направляющих нитей в указанных тканях. На фиг. 2А представлены тканевые флуоресцентные изображения Су3-меченных миРНК, конъюгированных с различными функциональными фрагментами в ткани печени, почек и плаценты. На фиг. 2В показано накопление направляющей цепи, количественно определенное через 48 часов с помощью анализа гибридизации РНА (*n*=3). Значения *p* описывают статистически значимые различия между каждым соединением и соединением, конъюгированным с холестерином (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA; ** *p*<0,01; *** *p*<0,001; статистически незначимые различия не отмечены). NOC - нет конъюгата, Chol - холестерин, DCA - докозановая кислота, PC-DCA - фосфохолин-докозановая кислота, DHA - докозагексановая кислота, PC-DHA - фосфохолин-докозагексановая кислота, DIO - двухразветвленный олигонуклеотид.

[0100] *На фиг. 3А - фиг. 3Д* показано накопление тестируемых миРНК в ткани костного мозга. Был проведен FACS-анализ клеток костного мозга мышей CD-1, которым инъецировали варианты миРНК sFLT1_2283, меченные Су3. На фиг. 3А изображена схема гейтирования, используемая для количественной оценки интенсивности Су3 в

определенных популяциях клеток костного мозга на фиг. 3В - фиг. 3D. На фиг. 3В представлена гистограмма частотного распределения интенсивности флуоресценции Су3 (слева) и диаграммы средней интенсивности флуоресценции Су3 (справа) нейтрофилов костного мозга через 24 часа после инъекции вариантов миРНК. На фиг. 3С представлена гистограмма частотного распределения интенсивности флуоресценции Су3 (слева) и диаграммы средней интенсивности флуоресценции Су3 (справа) гранулоцитов костного мозга через 24 часа после инъекции вариантов миРНК. На фиг. 3D представлена гистограмма частотного распределения интенсивности флуоресценции Су3 (слева) и диаграммы средней интенсивности флуоресценции Су3 (справа) моноцитов костного мозга через 24 часа после инъекции вариантов миРНК. ($n=3$, среднее \pm СО) значения p описывают статистически значимые различия между соединениями (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA; * $p<0,05$; статистически незначимые различия не отмечены).

[0101] **На фиг. 4А - фиг. 4F** показано влияние различных 5'-антисмысловых модификаций на эффективность сайленсинга миРНК. Беременным мышам CD-1 вводили 20 мг/кг эквимольной смеси вариантов миРНК 2283 и 2519 в эмбриональные дни (E) 13 и E14. На фиг. 4А показаны схематические изображения химической структуры инъецированных соединений миРНК и химические структуры тестируемых 5' фрагментов. На фиг. 4В изображены уровни мРНК *sFlt1-i13* в плаценте на E18, измеренные с помощью анализа РНК Quantigene 2.0. Уровни были нормализованы по *Flt1* и представлены как процент от контроля PBS ($n=5$, среднее \pm СО). На фиг. 4С показано количество накопления миРНК в плаценте на E18, измеренное с помощью анализа гибридизации ПНК ($n=5$). Значения p описывают статистически значимые различия между соединениями (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA; ** $p<0,01$; **** $p<0,0001$; статистически незначимые различия не отмечены). На фиг. 4D представлены уровни мРНК *sFlt1-i13* в плаценте на E18, измеренные с помощью анализа РНК Quantigene 2.0. Уровни были нормализованы по *Flt1* и представлены как процент от контроля PBS ($n=6$, среднее \pm СО). На фиг. 4Е показано количество накопления миРНК в плаценте на E18, измеренное с помощью анализа гибридизации ПНК ($n=6$). Значения p описывают статистически значимые различия между соединениями (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA; ** $p<0,01$; **** $p<0,0001$; статистически незначимые различия не отмечены). Непарный t-тест; # $p<0,05$; ##### $p<0,0001$). На фиг. 4F показано среднее количество детенышей мышей, средний вес детенышей и средний вес плаценты контрольных и обработанных беременных мышей.

[0102] **На фиг. 5** показано влияние оптимизированной миРНК на выработку цитокинов в сыворотке крови. Измеряли уровни цитокинов в сыворотке крови мышей CD-1 через 24 часа после инъекции 75 мг/кг вариантов миРНК sFLT1_2283 ($n=3$, среднее \pm СО). Значения p описывают статистически значимые различия между соединениями (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$; статистически незначимые различия не отмечены).

[0103] **На фиг. 6** представлена схема иллюстративной мишени миРНК sFLT1 2283 или 2519.

[0104] **На фиг. 7** представлены кривые зависимости «доза-ответ» миРНК-2238 и миРНК-2519, подавляющих *sFLT1-il3* и *sFLT1-e15a* (соответственно), или комбинации двух миРНК (миРНК-2238:миРНК-2519 1:1). Уровни экспрессии мРНК *sFLT1-il3* и *sFLT1-e15a* и уровни белка sFLT1 измеряли при каждой из тестируемых концентраций миРНК.

[0105] **На фиг. 8А - фиг. 8С** представлены результаты экспериментов *in vivo*, проведенных на модели пониженной маточно-плацентарной перфузии у беременных крыс (RUPP). На фиг. 8А представлена схема лечения на крысиной модели RUPP, получающей комбинацию двух миРНК (смесь 1:1 миРНК-2283 (нацеленной на *nasFlt1-il3*) и миРНК-2519 (нацеленной на *nasFlt1-e15a*)). На фиг. 8В показано кровяное давление матери и вес плаценты у прошедших лечение и контрольных крыс. На фиг. 8С показано поглощение плода и вес плода у крыс, прошедших лечение, и контрольных крыс.

[0106] **На фиг. 9** изображена химическая структура оптимизированных молекул миРНК sFLT1 2283 и sFLT1 2519.

[0107] **На фиг. 10А - фиг. 10В** изображена химическая структура оптимизированной молекулы миРНК sFLT1 2283. На фиг. 10А изображена антисмысловая цепь, а на фиг. 10В изображена смысловая цепь.

[0108] **На фиг. 11А - фиг. 11В** изображена химическая структура оптимизированной молекулы миРНК sFLT1 2519. На фиг. 11А изображена антисмысловая цепь, а на фиг. 11В изображена смысловая цепь.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0109] Предложены новые ангиогенные мишени (например, последовательности-мишени ПЭ, например, последовательности интронов мРНК *sFlt1*). Также предложены новые миРНК, которые избирательно нацелены на интронные области мРНК, кодирующие ангиогенные мишени (например, белки sFLT1). Также предложены способы лечения ангиогенных расстройств, например, ПЭ, послеродовой ПЭ, эклампсии и/или HELLP.

[0110] В общем, номенклатура, применяемая в связи с культурой клеток и тканей, молекулярной биологией, иммунологией, микробиологией, генетикой и химией белков и нуклеиновых кислот, а также гибридизацией, описанной в данном документе, хорошо известна и широко применяется в данной области техники. Способы и методики, представленные в данном документе, обычно выполняются в соответствии с традиционными способами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании, если не указано иное. Методики ферментативных реакций и очищения осуществляют в соответствии с указаниями производителя, как широко применяются в данной области, или как описано в данном документе. Номенклатура, применяемая в связи с описанными в данном документе лабораторными процедурами и

способами аналитической химии, синтетической органической химии, медицинской и фармацевтической химии, хорошо известна и широко применяется в данной области техники. Стандартные способы применяются для химического синтеза, химического анализа, фармацевтического приготовления, составления и доставки, а также лечения пациентов.

[0111] Если в данном документе не указано иное, научные и технические термины, применяемые в данном документе, имеют значения, которые обычно понятны для специалистов в данной области техники. В случае любой скрытой двусмысленности определения, представленные в данном документе, имеют приоритет над любым словарным или внешним определением. Если иное не требуется по контексту, термины в единственном числе включают множественное число, а термины во множественном числе включают единственное число. Использование «или» означает «и/или», если не указано иное. Применение термина «включающий», а также других форм, например, «включает» и «включительно», является неограничивающим.

[0112] Чтобы изобретение было более понятным, сначала представлены определения некоторых терминов.

[0113] Под «изменением» подразумевают изменение (увеличение или снижение) уровней экспрессии гена, мРНК или полипептида, определяемых стандартными известными способами, такими как описанные в данном документе. В контексте данного документа увеличение или уменьшение включает изменение уровня экспрессии на 10%, изменение на 25%, изменение на 40% или изменение уровня экспрессии на 50% или более. В некоторых вариантах осуществления увеличение или уменьшение представляет собой изменение уровней экспрессии между около 30% и около 50% или между около 30% и около 40%. «Изменение» также может указывать на изменение (увеличение или уменьшение) биологической активности любой из мРНК или полипептидов по изобретению (например, *sFlt1* (например, *sFlt1-i13* короткий, *sFlt1-i13* длинный и/или *sFlt1-i15a* (также известный как *sFlt1-e15a*)). Примеры биологической активности sFlt-1 включают один или несколько клинических симптомов ПЭ или эклампсии. В контексте данного документа увеличение или уменьшение включает изменение биологической на 10%, предпочтительно на 25%, более предпочтительно на 40% и наиболее предпочтительно на 50% или более. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления увеличение или уменьшение представляет собой изменение уровней экспрессии между около 30% и около 50% или между около 30% и около 40%.

[0114] Некоторые варианты осуществления изобретения направлены на лечение одного или нескольких ангиогенных расстройств. Под «лечением ангиогенного расстройства» подразумевают использование олигонуклеотида (например, мРНК) по изобретению в фармацевтической композиции для лечения заболеваний, включающих физиологические и патологические процессы неоваскуляризации, васкулогенеза и/или ангиогенеза. По существу, эти фармацевтические композиции полезны для лечения заболеваний, состояний и расстройств, которые требуют ингибирования

неоваскуляризации, васкулогенеза или ангиогенеза, включая, но не ограничиваясь этим, рост и метастазирование раковых опухолей, новообразования, глазную неоваскуляризацию (включая дегенерацию желтого пятна, диабетическую ретинопатию, ишемическую ретинопатию, ретинопатию недоношенных, хориоидальную неоваскуляризацию), ревматоидный артрит, остеоартрит, хроническую астму, септический шок, воспалительные заболевания, синовит, деструкцию костей и хрящей, рост паннуса, образование остеофитов, остеомиелит, псориаз, ожирение, гемангиому, саркому Капоши, атеросклероз (в том числе разрыв атеросклеротической бляшки), эндометриоз, бородавки, избыточное оволосение, келоидные рубцы, аллергические отеки, дисфункциональные маточные кровотечения, фолликулярные кисты, гиперстимуляцию яичников, эндометриоз, остеомиелит, воспалительные и инфекционные процессы (гепатит, пневмония, гломерулонефрит), бронхиальную астму, носовые полипы, трансплантацию, регенерацию печени, лейкомаляцию, тиреоидит, увеличение щитовидной железы, лимфопролиферативные заболевания, гематологические злокачественные новообразования, сосудистые пороки развития, преэклампсию, эклампсию и/или HELLP-синдром. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой преэклампсию. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой послеродовую преэклампсию. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой эклампсию. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой синдром HELLP.

[0115] Под «преэклампсией» («ПЭ») понимают мультисистемное заболевание, характеризующееся гипертензией с протеинурией или отеками, или тем и другим, а также одной или несколькими гломерулярными дисфункциями, отеком мозга, отеком печени или расстройствами свертываемости крови вследствие беременности или влияния недавно перенесенной беременности. ПЭ обычно возникает после 20-й недели беременности. ПЭ обычно определяется как некоторая комбинация следующих симптомов: (1) систолическое артериальное давление (АД) > 140 мм рт. ст. и диастолическое АД > 90 мм рт. ст. после 20 недель беременности (обычно измеряется дважды с интервалом 4-168 часов); (2) впервые возникшая протеинурия (1+ по индикаторной полоске в анализе мочи, > 300 мг белка в 24-часовом сборе мочи или один случайный образец мочи с соотношением белок/креатинин > v0,3) и (3) разрешение гипертензии и протеинурии к 12 неделям послеродового периода.

[0116] Тяжелая ПЭ обычно определяется как (1) диастолическое АД > 110 мм рт.ст. (обычно измеряется в двух случаях с интервалом 4-168 часов) или (2) протеинурия, характеризующаяся измерением 3,5 г или более белка в 24-часовом сборе мочи двух случайных образцов мочи с белком не менее 3+ по тест-полоске. При ПЭ гипертензия и протеинурия обычно возникают с разницей в семь дней друг от друга. При тяжелой ПЭ тяжелая гипертензия, тяжелая протеинурия и синдром HELLP (гемолиз, повышение активности печеночных ферментов, низкий уровень тромбоцитов) или эклампсия могут

возникать одновременно или только по одному симптому.

[0117] Иногда тяжелая ПЭ может приводить к развитию судорог. Эта тяжелая форма синдрома называется «эклампсией». Эклампсия может также включать дисфункцию или повреждение нескольких органов или тканей, таких как печень (например, гепатоцеллюлярное повреждение, перипортальный некроз) и центральной нервной системы (например, отек мозга и кровоизлияние в мозг). Считается, что этиология судорог вторична по отношению к развитию отека мозга и очагового спазма мелких кровеносных сосудов в почках.

[0118] Под синдромом «HELLP» подразумевают группу симптомов, возникающих у беременной женщины, характеризующихся гемолизом, повышением активности печеночных ферментов и низким количеством тромбоцитов. Считается, что синдром HELLP является вариантом ПЭ, но может быть и самостоятельным явлением.

[0119] В некоторых аспектах ПЭ включает послеродовую ПЭ. Послеродовая ПЭ представляет собой редкое заболевание, которое возникает, когда у женщины наблюдается высокое кровяное давление и избыток белка в моче вскоре после родов. Послеродовая ПЭ обычно развивается в течение 48 часов после родов. Однако иногда послеродовая ПЭ развивается в течение шести недель после родов, что известно как поздняя послеродовая ПЭ. Признаки и симптомы послеродовой ПЭ и поздней послеродовой ПЭ, как правило, аналогичны симптомам ПЭ, возникающей во время беременности, и могут включать один признак или любую комбинацию следующих признаков: высокое кровяное давление (т. е. 140/90 мм рт. ст. или выше; протеинурия; сильные головные боли). изменения зрения, включая временную потерю зрения, нечеткость зрения или чувствительность к свету; отек лица и конечностей; боль в верхней части живота, обычно под ребрами с правой стороны; тошнота или рвота; снижение мочеиспускания; внезапное увеличение веса, обычно более 2 фунтов (0,9 килограмма) в неделю.

[0120] Под «задержкой внутриутробного развития (ЗВУР)» подразумевается синдром, приводящий при рождении к весу, который составляет менее 10 процентов от прогнозируемого веса плода для его гестационного возраста. Текущим критерием низкой массы тела при рождении Всемирной организации здравоохранения является вес менее 2500 граммов (5 фунтов 8 унций) или ниже 10-го перцентиля для гестационного возраста, согласно американским таблицам веса при рождении для гестационного возраста в зависимости от расы, паритета и пола младенца (Zhang and Bowes, *Obstet. Gynecol.* 86:200-208, 1995). Таких детей с низкой массой тела при рождении также называют «маловесный для гестационного возраста (SGA)». ПЭ представляет собой состояние, которое, как известно, связано с ЗВУР или SGA.

[0121] Определенные варианты осуществления изобретения направлены на лечение одного или нескольких заболеваний почек. Под «лечением заболевания почек» подразумевают применение олигонуклеотида (например, миРНК) по изобретению в фармацевтической композиции для лечения заболеваний, состояний или расстройств,

связанных с почками. Заболевания, состояния или расстройства, связанные с почками, включают, но не ограничиваются этим, хроническую болезнь почек (ХБП) (стадии 1-5, причем стадия 1 является самой легкой и обычно вызывает мало симптомов, а стадия 5 представляет собой тяжелое заболевание с низкой продолжительностью жизни при отсутствии лечения, 5 стадию ХБП часто называют болезнью почек в конечной стадии, почечной недостаточностью в конечной стадии или хронической почечной недостаточностью), и острую почечную недостаточность (ОПН) (вызванную травматическим повреждением с кровопотерей, внезапное снижение притока крови к почкам, повреждение почек в результате сепсиса, обструкции оттока мочи, повреждение некоторыми лекарственными средствами или токсинами, осложнения беременности (например, эклампсия, синдром ПЭ и/или HELLP) и тому подобное).

[0122] Определенные варианты осуществления изобретения направлены на лечение одного или нескольких заболеваний печени. Под «лечением заболевания печени» подразумевают применение олигонуклеотида (например, миРНК) по изобретению в фармацевтической композиции для лечения заболеваний, состояний или расстройств, связанных с печенью. Заболевания, состояния или расстройства, связанные с печенью, включают, помимо прочего, фасциолез, гепатит (например, вирусный гепатит, алкогольный гепатит, аутоиммунный гепатит, наследственный гепатит и т.п.), алкогольное заболевание печени (включая алкогольную жировую болезнь печени, алкогольный гепатит и алкогольный цирроз), неалкогольную жировую болезнь печени, стеатогепатит, неалкогольный цирроз, первичный рак печени (например, гепатоцеллюлярную карциному, холангиокарциному, ангиосаркому, гемангиосаркому и т.п.), первичный билиарный цирроз, первичный склероз, центрилобулярный некроз, синдром Бадда - Киари, гемохроматоз, болезнь Вильсона, дефицит альфа-1-антитрипсина, болезнь накопления гликогена II типа, наследственный транстиретин-ассоциированный амилоидоз, синдром Жильбера, билиарную атрезию, дефицит альфа-1-антитрипсина, синдром Алажилля, прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз и т.п.

[0123] Под «терапевтическим количеством» подразумевается количество, которое при введении пациенту, страдающему от ПЭ или эклампсии, является достаточным для того, чтобы вызвать качественное или количественное уменьшение симптомов ПЭ или эклампсии, как описано в настоящем документе. «Терапевтическое количество» также может означать количество, которого при введении пациенту или субъекту, страдающему от ПЭ или эклампсии, достаточно, чтобы вызвать снижение уровней экспрессии одного или нескольких белков sFLT1 (например, одного или нескольких коротких sFLT1-i13, длинных sFLT1-i13 и sFLT1-i15a), измеренных с помощью одного или нескольких анализов, описанных в данном документе.

[0124] Под «субъектом» подразумевается млекопитающее, включая, но не ограничиваясь этим, прочего, человека или млекопитающих, не являющихся человеком, таких как приматы, отличные от человека, или другие животные, такие как, например, крупный рогатый скот, лошадь, собака, овца, кошка, мышь и т.п. В это определение

включены беременные, послеродовые и небеременные млекопитающие.

[0125] Под «растворимым FLT1 (sFLT1)» (также известным как sVEGF-R1) подразумевается растворимая форма рецептора FLT1, которая обладает биологической активностью sFLT1 (например, короткий *sFLT1-i13*, длинный *sFLT1-i13* и/или *sFLT1-i15a* (также известный как *sFLT1-e15a*)). Биологическую активность полипептида sFLT1 можно анализировать используя любой стандартный способ, например, путем анализа одного или нескольких клинических симптомов ПЭ, послеродовой ПЭ, эклампсии и/или HELLP, путем анализа мРНК sFLT1 и/или уровней белка, путем анализа связывание sFLT1 с VEGF и т.п. Белки sFLT1 лишены трансмембранного домена и цитоплазматического тирозинкиназного домена рецептора FLT1. Белки sFLT1 могут связываться с VEGF, а PlGF связываются с высоким сродством, но не могут индуцировать пролиферацию или ангиогенез и, следовательно, функционально отличаются от рецепторов FLT1 и KDR. sFLT1 первоначально был выделен из эндотелиальных клеток пуповины человека, а позже было показано, что он продуцируется клетками трофобласта *in vivo*. В контексте данного документа *sFLT1* включает любой член или изоформу семейства *sFLT1*, например, *sFLT1-i13* (например, короткий *sFLT1-i13* и/или длинный *sFLT1-i13* (*sFLT1_v1*), *sFLT1-i15a* (*sFLT1_v2*), *sFLT1-e15a*, *sFLT1_v3*, *sFLT1_v4* и тому подобное.

[0126] Последовательность короткой изоформы *sFLT1-i13* представляет собой:

[0127]

GTGAGCACTGCAACAAAAAGGCTGTTTTCTCTCGGATCTCCAAATTTAAAAGCACAA
GGAATGATTGTACCACACAAAGTAATGTAACATTAAGGACTCATTA AAAAGTA
A (SEQ ID NO:5).

[0128] Последовательность длинной изоформы *sFLT1-i13* представляет собой:
GAAGAAAGAAATTACAATCAGAGGTGAGCACTGCAACAAAAAGGCTGTTTTCTCTC
GGATCTCCAAATTTAAAAGCACAAAGGAATGATTGTACCACACAAAGTAATGTA AAA
CATTAAGGACTCATTA AAAAGTAACAGTTGTCTCATATCATCTTGATTTATTGTCA
CTGTTGCTAACTTTCAGGCTCGGAGGAGATGCTCCTCCCAAAATGAGTTCGGAGATG
ATAGCAGTAATAATGAGACCCCGGGCTCCAGCTCTGGGCCCCCATTGAGGCCGA
GGGGGCTGCTCCGGGGGGCCGACTTGGTGCACGTTTGGATTTGGAGGATCCCTGCAC
TGCCTTCTCTGTGTTTGTGCTCTTGCTGTTTTCTCCTGCCTGATAAACAACAACCTTG
GGATGATCCTTTCCATTTTGATGCCAACCTCTTTTATTTTAAAGCGGCGCCSTATAG
T (SEQ ID NO:6).

[0129] Последовательность изоформы *sFLT1-i15a* (также известной как *sFLT1-e15a*) представляет собой:

AACTGTATACATCAACGTCACCATCGTCATCGTCATCATCACCATTTGTCATCATCATC
ATCATCGTCATCATCATCATCATCATAGCTATCATCATTTATCATCATCATCATCATCA
TCATCATAGCTACCATTTATTGAAAACSTATTATGTGTCAACTTCAAAGAACTTATCCT
TTAGTTGGAGAGCCAAGACAATCATAACAATAACAATGGCCGGGCATGGTGGCTC
ACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCAGGTGGATCATTTGAGGTCAG

GAGTCCAAGACCAGCCTGACCAAGATGGTGAAATGCTGTCTCTATTAAAAATACAA
 AATTAGCCAGGCATGGTGGCTCATGCCTGTAATGCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGA
 CAGGAGAATCACTTGAACCCAGGAGGCAGAGGTTGCAGGGAGCCGAGATCGTGTAC
 TGCACTCCAGCCTGGGCAACAAGAGCGAAACTCCGTCTCAAAAAACAAATAAATAA
 AATAAATAAACAAGACAAAATTCACTTTTTATTCTATTAAACTTAAACATACATGC
 TAA (SEQ ID NO:7).

[0130] Уровни белка sFLT1 измеряют путем измерения количества свободного, связанного (т. е. связанного с фактором роста) или общего sFLT1 (связанного+свободного). Уровни VEGF или PlGF определяют путем измерения количества свободного PlGF или свободного VEGF (т.е. не связанного с sFLT1). Один из иллюстративных показателей представляет собой $[sFLT1/(VEGF+PlGF)]$, также называемый антиангиогенным индексом ПЭ (РААИ).

[0131] Под «индексом антиангиогенеза преэклампсии (РААИ)» понимают соотношение $sFLT1/VEGF+PlGF$, используемое в качестве индикатора антиангиогенной активности. РААИ более 20 считается показателем ПЭ или риска ПЭ.

[0132] Под «фактором роста эндотелия сосудов (VEGF)» подразумевается фактор роста млекопитающих, который гомологичен фактору роста, определенному в патентах США №№ 5332671; 5240848; 5194596; и Charnock-Jones et al. (Biol. Reproduction, 48: 1120-1128, 1993), и обладает биологической активностью VEGF. VEGF существует в виде гликозилированного гомодимера и включает по меньшей мере четыре различных альтернативно сплайсированных изоформы. Биологическая активность нативного VEGF включает стимулирование избирательного роста эндотелиальных клеток сосудов или эндотелиальных клеток пупочной вены и индукции ангиогенеза. В контексте данного документа VEGF включает любой член или изоформу семейства VEGF (например, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF189, VEGF165 или VEGF 121). В некоторых вариантах осуществления VEGF представляет собой изоформу VEGF121 или VEGF 165 (Tischer et al., J. Biol. Chem. 266, 11947-11954, 1991; Neufed et al. Cancer Metastasis 15:153-158, 1996), которая описана в пат. США. №№ 6447768; 5219739; и 5194596, включенных в данное описание посредством ссылки. Также включены мутантные формы VEGF, такие как KDR-селективный VEGF и Flt-селективный VEGF, описанные Gille et al. (J. Biol. Chem. 276:3222-3230, 2001). VEGF включает формы человека и может включать формы VEGF других животных (например, мыши, крысы, собаки, курицы и т.п.).

[0133] Под «плацентарным фактором роста (PlGF)» понимают фактор роста млекопитающих, который гомологичен белку, определенному номером доступа P49763 в базе генетических данных, и который обладает биологической активностью PlGF. PlGF представляет собой гликозилированный гомодимер, принадлежащий к семейству VEGF, и его можно обнаружить в двух различных изоформах посредством альтернативных механизмов сплайсинга. PlGF экспрессируется цито- и синцитиотрофобластами в плаценте, а биологическая активность PlGF включает индукцию пролиферации, миграции

и активацию эндотелиальных клеток, особенно клеток трофобласта.

[0134] Под «трофобластом» подразумевают слой мезектодермальных клеток, покрывающий бластоцисту, который прорастает в слизистую оболочку матки и через которую эмбрион получает питание от матери. Клетки трофобласта способствуют образованию плаценты.

[0135] Термин «нуклеозид» относится к молекуле, имеющей пуриновое или пиримидиновое основание, ковалентно связанное с сахаром рибозой или дезоксирибозой. Типичные нуклеозиды включают аденозин, гуанозин, цитидин, уридин и тимидин. Дополнительные типичные нуклеозиды включают инозин, 1-метилюанозин, псевдоуридин, 5,6-дигидроуридин, риботимидин, ²N-метилгуанозин и ^{2,2}N,N-диметилгуанозин (также называемые «редкими» нуклеозидами). Термин «нуклеотид» относится к нуклеозиду, имеющему одну или несколько фосфатных групп, соединенных сложноэфирными связями с сахарным фрагментом. Типичные нуклеотиды включают нуклеозидмонофосфаты, дифосфаты и трифосфаты. В контексте данного документа термины «полинуклеотид» и «молекула нуклеиновой кислоты» используются взаимозаменяемо и относятся к полимеру нуклеотидов, соединенных вместе фосфодиэфирной связью между 5'- и 3'-атомами углерода.

[0136] Термин «РНК» или «молекула РНК» или «молекула рибонуклеиновой кислоты» относится к полимеру рибонуклеотидов (например, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 или более рибонуклеотидов). Термин «ДНК» или «молекула ДНК» или «молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты» относится к полимеру дезоксирибонуклеотидов. ДНК и РНК могут быть синтезированы естественным путем (например, путем репликации ДНК или транскрипции ДНК, соответственно). РНК может быть посттранскрипционно модифицирована. ДНК и РНК также можно синтезировать химическим путем. ДНК и РНК могут быть одноцепочечными (т.е. оцРНК и оцДНК соответственно) или многоцепочечными (например, двухцепочечными, т.е. дцРНК и дцДНК, соответственно). «мРНК» или «информационная матричная РНК» представляет собой одноцепочечную РНК, которая определяет аминокислотную последовательность одной или нескольких полипептидных цепей. Эта информация транслируется в процессе синтеза белка, когда рибосомы связываются с мРНК.

[0137] В контексте данного документа термин «малая интерферирующая РНК» («миРНК») (также упоминаемый в данной области как "короткие интерферирующие РНК") относится к РНК (или аналогу РНК), содержащей около 10-50 нуклеотидов (или нуклеотидных аналогов), которая способна направлять или опосредовать интерференцию РНК. Предпочтительно, миРНК содержит около 15-30 нуклеотидов или аналогов нуклеотидов, более предпочтительно около 16-25 нуклеотидов (или аналогов нуклеотидов), еще более предпочтительно около 18-23 нуклеотидов (или аналогов нуклеотидов) и еще более предпочтительно около 19-22 нуклеотидов (или аналогов нуклеотидов) (например, 19, 20, 21 или 22 нуклеотида или аналогов нуклеотидов). Термин «короткая» миРНК относится к миРНК, содержащей около 21 нуклеотида (или аналогов

нуклеотидов), например, 19, 20, 21 или 22 нуклеотида. Термин «длинная» миРНК относится к миРНК, содержащей около 24-25 нуклеотидов, например, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов. Короткие миРНК могут в некоторых случаях включать менее 19 нуклеотидов, например, 16, 17 или 18 нуклеотидов, при условии, что более короткая миРНК сохраняет способность опосредовать РНКи. Аналогично, длинные миРНК могут в некоторых случаях включать более 26 нуклеотидов при условии, что более длинная миРНК сохраняет способность опосредовать РНКи без дальнейшей обработки, например, ферментативной обработки, до короткой миРНК.

[0138] Термин «аналог нуклеотида», или «измененный нуклеотид», или «модифицированный нуклеотид» относится к нестандартному нуклеотиду, включая не встречающиеся в природе рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды. Типичные аналоги нуклеотидов модифицируются в любом положении, чтобы изменить определенные химические свойства нуклеотида, сохраняя при этом способность аналога нуклеотида выполнять намеченную функцию. Примеры положений нуклеотида, которые могут быть дериватизированы, включают положение 5, например, 5-(2-амино)пропилирудин, 5-бромурин, 5-пропинуридин, 5-пропенилирудин и т.д.; положение 6, например, 6-(2-амино)пропилирудин; положение 8 для аденозина и/или гуанозина, например, 8-бромгуанозин, 8-хлоргуанозин, 8-фторгуанозин и т.д. Аналоги нуклеотидов также включают дезануклеотиды, например, 7-дезааденозин; O- и N-модифицированные (например, алкилированные, например, N6-метиладенозин или другие известные в данной области техники) нуклеотиды; и другие гетероциклически модифицированные аналоги нуклеотидов, описанные в Herdewijn, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 2000 Aug. 10(4):297-310.

[0139] Аналоги нуклеотидов также могут содержать модификации сахарной части нуклеотидов. Например, 2' ОН-группа может быть заменена группой, выбранной из H, OR, R, F, Cl, Br, I, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, COOR или OR, где R представляет собой замещенный или незамещенный C₁-C₆ алкил, алкенил, алкинил, арил и т.д. Другие возможные модификации включают те, которые описаны в патентах США No. №№ 5858988 и 6291438.

[0140] Фосфатная группа нуклеотида также может быть модифицирована, например, путем замены одного или нескольких атомов кислорода фосфатной группы серой (например, тиофосфатами) или путем осуществления других замен, которые позволяют нуклеотиду выполнять намеченную функцию, как описано, например, в Eckstein, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000 Apr. 10(2):117-21, Rusckowski et al. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000 Oct. 10(5):333-45, Stein, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2001 Oct. 11(5): 317-25, Vorobjev et al. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2001 Apr. 11(2):77-85, and U.S. Pat. No. 5,684,143. Некоторые из вышеупомянутых модификаций (например, модификации фосфатных групп) предпочтительно снижают скорость гидролиза, например, полинуклеотидов, содержащих указанные аналоги, *in vivo* или *in vitro*.

[0141] Термин «олигонуклеотид» относится к короткому полимеру нуклеотидов и/или аналогам нуклеотидов. Термин «аналог РНК» относится к полинуклеотиду (например, химически синтезированному полинуклеотиду), имеющему по меньшей мере один измененный или модифицированный нуклеотид по сравнению с соответствующей неизменной или немодифицированной РНК, но сохраняющему ту же или аналогичную природу или функцию, что и соответствующий неизменный или немодифицированный РНК. Как обсуждалось выше, олигонуклеотиды могут быть связаны связями, которые приводят к более низкой скорости гидролиза аналога РНК по сравнению с молекулой РНК с фосфодиэфирными связями. Например, нуклеотиды аналога могут содержать метилendiол, этилендиол, оксиметилтио, оксиэтилтио, оксикарбонилокси, фосфордиамидатные, фосфорамидатные и/или тиофосфатные связи. Предпочтительные аналоги РНК включают рибонуклеотиды с модифицированным сахаром и/или остовом и/или дезоксирибонуклеотиды. Такие изменения или модификации могут дополнительно включать добавление ненуклеотидного материала, например, к концу(ам) РНК или внутрь (к одному или нескольким нуклеотидам РНК). Аналог РНК должен быть достаточно похож на природную РНК, чтобы иметь способность опосредовать (опосредовать) РНК-интерференцию.

[0142] В контексте данного документа термин «РНК-интерференция» («РНКи») относится к селективной внутриклеточной деградции РНК. РНКи естественным образом возникает в клетках для удаления чужеродных РНК (например, вирусных РНК). Природная РНКи протекает через фрагменты, отщепленные от свободной дцРНК, которые направляют механизм деградции на другие подобные последовательности РНК. В качестве альтернативы, РНКи может быть инициирована рукой человека, например, для подавления экспрессии генов-мишеней.

[0143] Агент РНКи, например, агент сайленсинга РНК, имеющий цепь, которая является «последовательностью, достаточно комплементарной целевой последовательности мРНК для направления специфической РНК-интерференции (РНКи)», означает, что цепь имеет последовательность, достаточную для запуска разрушения мРНК-мишени с помощью механизма или процесса РНКи.

[0144] В контексте данного документа термин «изолированная РНК» (например, «изолированная миРНК» или «изолированный предшественник миРНК») относится к молекулам РНК, которые по существу не содержат другого клеточного материала или культуральной среды, если они получены рекомбинантными технологиями, или по существу не содержат химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе.

[0145] В контексте данного документа термин «РНК сайленсинг» относится к группе специфичных для последовательности регуляторных механизмов (например, РНК-интерференция (РНКи), подавление транскрипционного гена (TGS), посттранскрипционное подавление гена (PTGS), подавление, ко-супрессия, и трансляционная репрессия), опосредованные молекулами РНК, которые приводят к

ингибированию или «сайленсингу» экспрессии соответствующего гена, кодирующего белок. Сайленсинг РНК наблюдался у многих типов организмов, включая растения, животных и грибы.

[0146] Термин «дискриминационный РНК сайленсинг» относится к способности молекулы РНК существенно ингибировать экспрессию «первой» или «целевой» полинуклеотидной последовательности, при этом несущественно ингибируя экспрессию «второй» или «нецелевой полинуклеотидной последовательности», например, когда обе полинуклеотидные последовательности присутствуют в одной и той же клетке. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность соответствует гену-мишени, тогда как нецелевая полинуклеотидная последовательность соответствует нецелевому гену. В других вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность соответствует целевому аллелю, тогда как нецелевая полинуклеотидная последовательность соответствует нецелевому аллелю. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой последовательность ДНК, кодирующую регуляторную область (например, промотор или энхансерные элементы) целевого гена. В других вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой целевую мРНК, кодируемую целевым геном.

[0147] Термин «*in vitro*» имеет общепризнанное в данной области значение, например, включающее очищенные реагенты или экстракты, например клеточные экстракты. Термин «*in vivo*» также имеет общепризнанное в данной области значение, например, включающее живые клетки, например, иммортализованные клетки, первичные клетки, клеточные линии и/или клетки организма.

[0148] В контексте данного документа термин «трансген» относится к любой молекуле нуклеиновой кислоты, которая искусственно вставлена в клетку и становится частью генома организма, который развивается из клетки. Такой трансген может включать ген, который частично или полностью гетерологичен (т.е. чужероден) трансгенному организму, или может представлять собой ген, гомологичный эндогенному гену организма. Термин «трансген» также означает молекулу нуклеиновой кислоты, которая включает одну или несколько выбранных последовательностей нуклеиновой кислоты, например, ДНК, которые кодируют один или несколько сконструированных предшественников РНК, подлежащих экспрессии в трансгенном организме, например, животного, который частично или полностью гетерологичен, т.е. чужероден трансгенному животному, или гомологичен эндогенному гену трансгенного животного, но предназначен для вставки в геном животного в месте, которое отличается от места расположения природного гена. Трансген включает один или несколько промоторов и любую другую ДНК, такую как интроны, необходимые для экспрессии выбранной последовательности нуклеиновой кислоты, функционально связанные с выбранной последовательностью, и может включать энхансерную последовательность.

[0149] Ген, «вовлеченный» в заболевание или расстройство, включает ген,

нормальная или аберрантная экспрессия или функция которого влияет или вызывает заболевание или расстройство или по меньшей мере один симптом указанного заболевания или расстройства.

[0150] В контексте данного документа термин «мутация приобретения функции», используемый в настоящем документе, относится к любой мутации в гене, в которой белок, кодируемый указанным геном (т.е. мутантный белок), приобретает функцию, обычно не связанную с данным белком (т.е. белок дикого типа), что вызывает или способствует развитию заболевания или расстройства. Мутация приобретения функции может представлять собой делецию, добавление или замену нуклеотида или нуклеотидов в гене, что приводит к изменению функции кодируемого белка. В одном варианте осуществления мутация приобретения функции изменяет функцию мутантного белка (например, вызывает выработку одного или нескольких белков sFLT1) или вызывает взаимодействие с другими белками. В другом варианте осуществления мутация приобретения функции вызывает уменьшение или удаление нормального белка дикого типа, например, за счет взаимодействия измененного мутантного белка с указанным нормальным белком дикого типа.

[0151] В контексте данного документа термин «ген-мишень» представляет собой ген, экспрессия которого должна быть существенно ингибирована или «подавлена». Это подавление может быть достигнуто путем сайленсинга РНК, например, путем расщепления мРНК целевого гена или трансляционной репрессии целевого гена. Термин «нецелевой ген» означает ген, экспрессию которого не следует существенно подавлять. В одном варианте осуществления полинуклеотидные последовательности целевого и нецелевого гена (например, мРНК, кодируемой целевым (sFLT1) и нецелевым (fFLT1) генами) могут отличаться одним или несколькими нуклеотидами, например, в интронной области. В другом варианте осуществления целевые и нецелевые гены могут отличаться одним или несколькими полиморфизмами (например, однонуклеотидными полиморфизмами или SNP). В другом варианте осуществления целевые и нецелевые гены могут иметь менее 100% идентичности последовательности. В другом варианте осуществления нецелевой ген может быть гомологом (например, ортологом или паралогом) целевого гена.

[0152] «Целевой аллель» представляет собой аллель (например, аллель SNP), экспрессию которого необходимо избирательно ингибировать или «подавлять». Это подавление может быть достигнуто путем сайленсинга РНК, например, путем расщепления мРНК целевого гена или целевого аллеля с помощью миРНК. Термин «нецелевой аллель» означает аллель, экспрессию которого не следует существенно сайленсировать. В некоторых вариантах осуществления целевые и нецелевые аллели могут соответствовать одному и тому же целевому гену. В других вариантах осуществления целевой аллель соответствует или связан с геном-мишенью, а нецелевой аллель соответствует или связан с нецелевым геном. В одном варианте осуществления полинуклеотидные последовательности целевого и нецелевого аллелей могут отличаться

на один или несколько нуклеотидов. В другом варианте осуществления целевой и нецелевой аллели могут отличаться одним или несколькими аллельными полиморфизмами (например, одним или несколькими SNP). В другом варианте осуществления целевые и нецелевые аллели могут иметь менее 100% идентичности последовательности.

[0153] В контексте данного документа термин «полиморфизм» относится к вариации (например, одной или нескольким делециям, вставками или заменами) в последовательности гена, которая выявляется или обнаруживается при сравнении одной и той же последовательности гена из разных источников или субъектов (но из одного и того же организма). Например, полиморфизм можно выявить при сравнении одной и той же последовательности гена от разных субъектов. Идентификация таких полиморфизмов является обычной практикой в данной области, причем методологии аналогичны тем, которые используются для обнаружения, например, точечных мутаций рака молочной железы. Идентификацию можно провести, например, по ДНК, выделенной из лимфоцитов субъекта, с последующей амплификацией полиморфных участков с использованием специфических праймеров к указанному полиморфному участку. Альтернативно, полиморфизм можно выявить при сравнении двух аллелей одного и того же гена. В конкретных вариантах осуществления полиморфизм представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP).

[0154] В контексте данного документа изменение последовательности между двумя аллелями одного и того же гена в организме называется «аллельным полиморфизмом». В некоторых вариантах осуществления аллельный полиморфизм соответствует аллелю SNP. Например, аллельный полиморфизм может включать однонуклеотидную вариацию между двумя аллелями SNP. Полиморфизм может проявляться в нуклеотиде внутри кодирующей области, но из-за вырожденности генетического кода никаких изменений в аминокислотной последовательности не кодируется. Кроме того, полиморфные последовательности могут кодировать другую аминокислоту в определенном положении, но изменение аминокислоты не влияет на функцию белка. Полиморфные области также можно обнаружить в некодирующих участках гена. В типичных вариантах осуществления полиморфизм обнаруживается в кодирующей области гена или в нетранслируемой области (например, 5'-UTR или 3'-UTR) гена.

[0155] В контексте данного документа термин «частота аллеля» представляет собой меру (например, долю или процент) относительной частоты аллеля (например, аллеля SNP) в одном локусе в популяции индивидуумов. Например, если популяция индивидов несет n локусов определенного хромосомного локуса (и гена, занимающего этот локус) в каждой из своих соматических клеток, то аллельная частота аллеля - это доля или процент локусов, которые аллель занимает внутри популяции. В конкретных вариантах осуществления аллельная частота аллеля (например, аллеля SNP) составляет по меньшей мере 10% (например, по меньшей мере 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% или более) в выборочной группе популяции.

[0156] В контексте данного документа термин «выборочная группа популяции» относится к популяции индивидуумов, состоящей из статистически значимого числа индивидов. Например, выборочная группа популяции может включать 50, 75, 100, 200, 500, 1000 или более индивидов. В конкретных вариантах осуществления выборочная группа популяции может включать индивидуумов, которые имеют, по меньшей мере, общий фенотип заболевания (например, расстройство приобретения функции) или мутацию (например, мутацию приобретения функции).

[0157] В контексте данного документа термин «гетерозиготность» относится к доле индивидов в популяции, которые являются гетерозиготными (например, содержат два или более различных аллелей) в конкретном локусе (например, в SNP). Гетерозиготность можно рассчитать для выборочной группы популяции с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области.

[0158] Фраза «изучение функции гена в клетке или организме» относится к изучению или исследованию возникающей из него экспрессии, активности, функции или фенотипа.

[0159] В контексте данного документа термин «агент сайленсинга РНК», относится к РНК, которая способна ингибировать или «сайленсировать» экспрессию целевого гена. В некоторых вариантах осуществления агент сайленсинга РНК способен предотвращать полный процессинг (например, полную трансляцию и/или экспрессию) молекулы мРНК посредством механизма посттранскрипционного сайленсинга. Агенты сайленсинга РНК включают небольшие (<50 п.н.) некодирующие молекулы РНК, например, дуплексы РНК, содержащие парные цепи, а также РНК-предшественники, из которых могут быть получены такие небольшие некодирующие РНК. Типичные агенты сайленсинга РНК включают миРНК, микроРНК, миРНК-подобные дуплексы и олигонуклеотиды с двойной функцией, а также их предшественников. В одном варианте осуществления агент сайленсинга РНК способен индуцировать РНК-интерференцию. В другом варианте осуществления агент сайленсинга РНК способен опосредовать трансляционную репрессию.

[0160] В контексте данного документа термин «редкий нуклеотид» относится к встречающемуся в природе нуклеотиду, который встречается нечасто, включая встречающиеся в природе дезоксирибонуклеотиды или рибонуклеотиды, которые встречаются нечасто, например, встречающийся в природе рибонуклеотид, который не является гуанозином, аденозином, цитозином или уридином. Примеры редких нуклеотидов включают, но не ограничиваются ими, инозин, 1-метилюинозин, псевдоуридин, 5,6-дигидроуридин, риботимидин, ²N-метилгуанозин и ^{2,2}N, N-диметилгуанозин.

[0161] Термин «сконструированный», как в случае сконструированного предшественника РНК или сконструированной молекулы нуклеиновой кислоты, указывает на то, что предшественник или молекула не встречается в природе, поскольку вся или часть последовательности нуклеиновой кислоты предшественника или молекулы

создана или выбрана человеком. После создания или выбора последовательность может быть реплицирована, транслирована, транскрибирована или иным образом обработана механизмами внутри клетки. Таким образом, предшественник РНК, полученный внутри клетки из трансгена, который включает сконструированную молекулу нуклеиновой кислоты, представляет собой сконструированный предшественник РНК.

[0162] В контексте данного документа термин «микроРНК» («микроРНК»), также называемый в данной области техники «малыми временными РНК» («мвРНК»), относится к небольшой (10-50 нуклеотидов) РНК, которая генетически кодируется (например, геномами вирусов, млекопитающих или растений) и способна направлять или опосредовать сайленсинг РНК. «Расстройство микроРНК» относится к заболеванию или расстройству, характеризующемуся aberrантной экспрессией или активностью микроРНК.

[0163] В контексте данного документа термин «двойной функциональный олигонуклеотид» относится к агенту, подавляющему РНК, имеющему формулу T-L-μ, где T представляет собой нацеливающий фрагмент мРНК, L представляет собой связывающий фрагмент и μ представляет собой рекрутирующий фрагмент микроРНК. В контексте данного документа термины «нацеливающий фрагмент мРНК», «нацеливающий фрагмент», «нацеливающая часть мРНК» или «нацеливающая часть» относятся к домену, части или области олигонуклеотида с двойной функциональностью, имеющего достаточный размер и достаточную комплементарность к части или области мРНК, выбранной или нацеленной для сайленсинга (т.е. фрагмент имеет последовательность, достаточную для захвата целевой мРНК). В контексте данного документа термин «связывающий фрагмент» или «связывающая часть» относится к домену, части или области РНК-подавляющего агента, который ковалентно соединяет или связывает мРНК.

[0164] В контексте данного документа термин «антисмысловая цепь» РНК-подавляющего агента, например, агента, подавляющего ми РНК, или РНК, относится к цепи, которая по существу комплементарна участку длиной около 10-50 нуклеотидов, например, около 15-30, 16-25, 18-23 или 19-22 нуклеотидов мРНК гена, предназначенного для сайленсинга. Антисмысловая цепь или первая цепь имеет последовательность, достаточно комплементарную последовательности желаемой мРНК-мишени, чтобы направить целевой сайленсинг, например, комплементарность, достаточную для запуска разрушения желаемой целевой мРНК механизмом или процессом РНКи (РНКи интерференция), или комплементарность, достаточную для запуска трансляционной репрессии желаемой целевой мРНК.

[0165] Термин «смысловая цепь» или «вторая цепь» РНК-подавляющего агента, например, агента, подавляющего миРНК или РНК, относится к цепи, которая комплементарна антисмысловой цепи или первой цепи. Антисмысловая и смысловая цепи также могут называться первой или второй цепью, причем первая или вторая цепь комплементарна целевой последовательности, а соответствующая вторая или первая цепь

комплементарна указанной первой или второй цепи. Промежуточные дуплексы микроРНК или подобные миРНК дуплексы включают цепь микроРНК, имеющую достаточную комплементарность участку длиной около 10-50 нуклеотидов мРНК гена, предназначенного для сайленсинга, и цепь микроРНК*, имеющую достаточную комплементарность для образования дуплекса с цепью микроРНК.

[0166] В контексте данного документа термин «направляющая цепь» относится к цепи агента, подавляющего РНК, например, антисмысловой цепи дуплекса миРНК или последовательности миРНК, которая входит в комплекс RISC и направляет расщепление целевой мРНК.

[0167] В контексте данного документа термин «асимметрия», как и в случае асимметрии дуплексной области агента, подавляющего РНК (например, стебля кшРНК), относится к неравенству прочности связи или силы спаривания оснований между концами агента, подавляющего РНК (например, между концевыми нуклеотидами на первой цепи или участке стебля и концевыми нуклеотидами на противоположной второй цепи или участке стебля), так что 5'-конец одной цепи дуплекса чаще находится во временном неспаренном состоянии, например, одноцепочечном состоянии, отличном от 5'-конца комплементарной цепи. Это структурное различие определяет, что одна цепь дуплекса предпочтительно включена в комплекс RISC. Цепь, 5'-конец которой менее прочно спарен с комплементарной цепью, будет предпочтительно включаться в RISC и опосредовать РНКи.

[0168] В контексте данного документа термин «прочность связи» или «сила пары оснований» относится к силе взаимодействия между парами нуклеотидов (или нуклеотидными аналогами) на противоположных цепях олигонуклеотидного дуплекса (например, дуплекса миРНК), обусловленного, главным образом, Н-связями, ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями и т.п. между указанными нуклеотидами (или аналогами нуклеотидов).

[0169] В контексте данного документа термин «5'-конец», например, 5'-конец антисмысловой цепи, относится к 5'-концевым нуклеотидам, например, между одним и около 5 нуклеотидами на 5'-конце антисмысловой цепи. В контексте данного документа термин «3'-конец», например, 3'-конец смысловой цепи, относится к области, например, области между одним и около 5 нуклеотидами, которая комплементарна нуклеотидам 5'-конца комплементарной антисмысловой цепи.

[0170] В контексте данного документа термин «дестабилизирующий нуклеотид» относится к первому нуклеотиду или аналогу нуклеотида, способному образовывать пару оснований со вторым нуклеотидом или аналогом нуклеотида, так что эта пара оснований имеет более низкую силу связи, чем традиционная пара оснований (т.е. пара оснований Уотсона-Крика). В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующий нуклеотид способен образовывать ошибочную пару оснований со вторым нуклеотидом. В других вариантах осуществления дестабилизирующий нуклеотид способен образовывать неоднозначную пару оснований со вторым нуклеотидом. В некоторых вариантах

осуществления дестабилизирующий нуклеотид способен образовывать промежуточную пару оснований со вторым нуклеотидом.

[0171] В контексте данного документа термин «пара оснований» относится к взаимодействию между парами нуклеотидов (или аналогов нуклеотидов) на противоположных цепях олигонуклеотидного дуплекса (например, дуплекса, образованного цепью агента, подавляющего РНК, целевой последовательностью мРНК), главным образом, благодаря Н-связям, взаимодействиям Ван-дер-Ваальса и т.п. между указанными нуклеотидами (или аналогами нуклеотидов). В контексте данного документа термин «прочность связи» или «прочность пары оснований» относится к прочности пары оснований.

[0172] В контексте данного документа термин «ошибочная пара оснований» относится к паре оснований, состоящей из некомплементарных или не-Ватсон-Криковских пар оснований, например, не обычных комплементарных пар оснований G:C, A:T или A:U. В контексте данного документа термин «неоднозначная пара оснований» (также известный как недискриминационная пара оснований) относится к паре оснований, образованной универсальным нуклеотидом.

[0173] В контексте данного документа термин «универсальный нуклеотид» (также известный как «нейтральный нуклеотид») включает те нуклеотиды (например, некоторые дестабилизирующие нуклеотиды), имеющие основание («универсальное основание» или «нейтральное основание»), которое существенно не различает основания на комплементарном полинуклеотиде при образовании пары оснований. Универсальные нуклеотиды представляют собой преимущественно гидрофобные молекулы, которые могут эффективно упаковываться в антипараллельные дуплексные нуклеиновые кислоты (например, двухцепочечную ДНК или РНК) благодаря стэкинг-взаимодействиям. Основные части универсальных нуклеотидов обычно содержат азотсодержащую ароматическую гетероциклическую группу.

[0174] В контексте данного документа термины «достаточная комплементарность» или «достаточная степень комплементарности» означают, что агент, подавляющий РНК имеет последовательность (например, в антисмысловой цепи, нацеливающем фрагменте мРНК или рекрутирующем фрагменте миРНК), которая является достаточной для связывания желаемой целевой РНК, соответственно, и инициирования РНК-сайленсинга целевой мРНК.

[0175] В контексте данного документа термин «трансляционная репрессия» относится к селективному ингибированию трансляции мРНК. Естественная трансляционная репрессия происходит за счет микроРНК, отщепленных от предшественников кшРНК. Как РНКи так и трансляционная репрессия опосредуются RISC. Как РНКи так и трансляционная репрессия происходят естественным путем или могут быть инициированы рукой человека, например, для подавления экспрессии генов-мишеней

[0176] Различные методики настоящего изобретения включают этап сравнения

значения, уровня, признака, характеристики, свойства и т.д. с «подходящим контролем», который в данном документе взаимозаменяемо называется «соответствующим контролем». Под «подходящим контролем» или «соответствующим контролем» понимается любой контроль или стандарт, известный специалисту в данной области, полезный для целей сравнения. В одном варианте осуществления «подходящий контроль» или «соответствующий контроль» представляет собой значение, уровень, признак, характеристику, свойство и т.д., определяемые до выполнения методики РНКи, описанной в данном документе. Например, скорость транскрипции, уровень мРНК, скорость трансляции, уровень белка, биологическая активность, клеточная характеристика или свойство, генотип, фенотип и т.д. могут быть определены до введения агента, подавляющего РНК, по настоящему изобретению в клетку или организм. В другом варианте осуществления «подходящий контроль» или «соответствующий контроль» представляет собой значение, уровень, признак, характеристику, свойство и т.д., определяемые в клетке или организме, например, контрольной или нормальной клетке или организме, проявляющем, например, нормальные черты. В еще одном варианте осуществления изобретения «подходящий контроль» или «соответствующий контроль» представляет собой заранее определенное значение, уровень, признак, характеристику, свойство и т.д.

[0177] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой принадлежит данное изобретение. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, можно использовать в практике или испытаниях по настоящему изобретению, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, включены в качестве ссылки во всей своей полноте. В случае противоречия настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не носят ограничительного характера.

[0178] В некоторых вариантах осуществления агенты, подавляющие РНК, по настоящему изобретению предназначены для нацеливания на интронные области в молекулах мРНК, кодирующих один или более белков sFLT1.

[0179] Объектами настоящего изобретения являются одна или несколько мРНК sFLT1 и соответствующие им белки. Одна цепь двухцепочечной РНК (миРНК) дополняет целевую последовательность мРНК sFLT1. После введения миРНК в субъект или клетку миРНК частично раскручивается, связывается с интронной целевой областью в мРНК sFLT1 сайт-специфическим образом и активирует нуклеазу мРНК. Эта нуклеаза расщепляет мРНК sFLT1, тем самым останавливая трансляцию белка sFLT1. Клетки избавляются от частично переваренной мРНК, тем самым предотвращая трансляцию, или клетки переваривают частично переваренные белки. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка sFLT1 снижается у субъекта или клетки на около 30-50%

или на около 30-40%.

[0180] В вариантах осуществления изобретения агенты сайленсинга РНК по настоящему изобретению способны нацеливаться на ген *flt1* человека, который можно обнаружить в положениях 2283 (5' CTCTCGGATCTCCAAATTТА 3' (SEQ ID NO:1)) или 2519 (5' CATCATAGCTACCATTTATT 3' (SEQ ID NO:2)).

[0181] Различные аспекты изобретения описаны более подробно в следующих подразделах.

I. Дизайн миРНК

[0182] В некоторых вариантах осуществления миРНК сконструированы следующим образом. Сначала выбирается часть гена-мишени (например, гена *flt1*), например, одна или более последовательностей мишеней, например, одна или любая комбинация *sFLT1-i13-2283*, *sFLT1-i15a-2519*, *sFLT1-i13-2318*, *sFLT1-i15a-2585* из интронной области целевого гена. Расщепление мРНК по этим сайтам должно исключить трансляцию соответствующего растворимого белка. Смысловые цепи были сконструированы на основе целевой последовательности. Предпочтительно часть (и соответствующая смысловая цепь) включает от около 30 до 35 нуклеотидов, например, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 нуклеотидов. Более предпочтительно, часть (и соответствующая смысловая цепь) включает 21, 22 или 23 нуклеотида. Однако для специалиста в данной области техники будет понятно, что миРНК, имеющие длину менее 19 нуклеотидов или более 25 нуклеотидов, также могут функционировать для опосредования РНКи. Соответственно, миРНК такой длины также входят в объем настоящего изобретения при условии, что они сохраняют способность опосредовать РНКи. Показано, что более длинные РНКи-агенты вызывают ответ на интерферон или РKR в некоторых клетках млекопитающих, что может быть нежелательно. Предпочтительно, чтобы РНКи-агенты по изобретению не вызывали РKR-ответа (т.е. имели достаточно короткую длину). Однако более длинные РНКи-агенты могут быть полезны, например, в типах клеток, неспособных генерировать ответ РKR, или в ситуациях, когда ответ РKR снижается или подавляется альтернативными способами.

[0183] Последовательность смысловой цепи спроектирована таким образом, что целевая последовательность находится по существу в середине цепи. Перемещение последовательности-мишени в нецентральное положение может в некоторых случаях снижать эффективность расщепления миРНК. Такие композиции, т.е. менее эффективные композиции, могут быть желательны для использования в случае обнаружения отмены сайленсинга мРНК дикого типа.

[0184] Антисмысловая цепь обычно имеет такую же длину, как и смысловая цепь, и содержит комплементарные нуклеотиды. В одном варианте осуществления нити являются полностью комплементарными, т.е. нити имеют тупые концы при выравнивании или отжиге. В другом варианте осуществления цепи выравниваются или отжигаются таким образом, что образуются выступающие части из 1, 2 или 3 нуклеотидов, т.е. 3'-конец смысловой цепи простирается на 1, 2 или 3 нуклеотида дальше, чем 5'-конец

антисмысловой цепи и/или 3'-конец антисмысловой цепи простирается на 1, 2 или 3 нуклеотида дальше, чем 5'-конец смысловой цепи. Выступающие части могут содержать (или состоять из) нуклеотиды, соответствующие последовательности гена-мишени (или ее комплементу). Альтернативно, выступающие части могут содержать (или состоять из них) дезоксирибонуклеотиды, например dT, или аналоги нуклеотидов, или другой подходящий ненуклеотидный материал.

[0185] Для облегчения входа антисмысловой цепи в RISC (и, таким образом, увеличения или улучшения эффективности целевого расщепления и сайленсинга), силу пары оснований между 5'-концом смысловой цепи и 3'-концом антисмысловой цепи можно изменить, например, уменьшить или сократить, как подробно описано в патентах США №№ 7,459,547, 7,772,203 и 7,732,593, озаглавленных «Methods and Compositions for Controlling Efficacy of RNA Silencing» (filed Jun. 2, 2003) и патентах США №№ 8,309,704, 7,750,144, 8,304,530, 8,329,892 и 8,309,705, озаглавленных «Methods and Compositions for Enhancing the Efficacy and Specificity of RNAi» (filed Jun. 2, 2003.), содержание которых включено в настоящий документ в полном объеме посредством данной ссылки. В одном варианте осуществления этих аспектов по изобретению сила пары оснований меньше из-за меньшего количества пар оснований G:C между 5'-концом первой или антисмысловой цепи и 3'-концом второй или смысловой цепи, чем между 3'-концом первой или антисмысловой цепи и 5'-конец второй или смысловой цепи. В другом варианте осуществления сила пары оснований меньше из-за по меньшей мере одной ошибочной пары оснований между 5'-концом первой или антисмысловой цепи и 3'-концом второй или смысловой цепи. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления ошибочная пара оснований выбрана из группы, состоящей из G:A, C:A, C:U, G:G, A:A, C:C и U:U. В другом варианте осуществления сила пары оснований меньше из-за по меньшей мере одной неоднозначной пары оснований, например, G:U, между 5'-концом первой или антисмысловой цепи и 3'-концом второй или смысловой цепи. В другом варианте осуществления сила пары оснований является меньшей из-за по меньшей мере одной пары оснований, содержащей редкий нуклеотид, например, инозин (I). В некоторых иллюстративных вариантах осуществления пара оснований выбрана из группы, включающей I:A, I:U и I:C. В другом варианте осуществления сила пары оснований является меньшей из-за по меньшей мере одной пары оснований, содержащей модифицированный нуклеотид. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления модифицированный нуклеотид выбран из группы состоящей из 2-амино-G, 2-амино-A, 2,6-диамино-G и 2,6-диамино-A.

[0186] Конструкция миРНК, подходящих для нацеливания на последовательности-мишени sFLT1, подробно описана ниже. миРНК могут быть сконструированы в соответствии с приведенными выше типовыми примерами для любых других последовательностей мишеней, обнаруженных в гене *flt1*. Более того, технология применима для нацеливания на любые другие последовательности-мишени, например, целевые последовательности, не вызывающие заболевания.

[0187] Чтобы подтвердить эффективность разрушения мРНК миРНК (например, мРНК sFLT1), миРНК можно инкубировать с кДНК (например, кДНК Flt1) в системе экспрессии мРНК на основе *дрозофилы in vitro*. Вновь синтезированные мРНК, меченные радиоактивным изотопом ^{32}P (например, мРНК Flt1), обнаруживаются автордиографически на агарозном геле. Наличие расщепленной мРНК указывает на нуклеазную активность мРНК. Подходящий контроль включает отсутствие миРНК. В качестве альтернативы выбирают контрольные миРНК, имеющие тот же нуклеотидный состав, что и выбранная миРНК, но не обладающие значительной комплементарностью последовательности соответствующему гену-мишени. Такие отрицательные контроли могут быть созданы путем случайного запутывания нуклеотидной последовательности выбранной миРНК; поиск гомологии может быть проведен для того, чтобы убедиться, что отрицательный контроль не имеет гомологии с любым другим геном в соответствующем геноме. Кроме того, можно создать миРНК отрицательного контроля путем введения в последовательность одной или более ошибочных пар оснований.

[0188] Участки комплементации миРНК-мРНК выбираются так, чтобы обеспечить оптимальную специфичность мРНК и максимальное расщепление мРНК.

II. Агенты РНКи

[0189] Настоящее изобретение включает молекулы миРНК, сконструированные, например, как описано выше. Молекулы миРНК по изобретению можно синтезировать химическим путем или транскрибировать *in vitro* из матрицы ДНК или *in vivo* из, например, кшРНК, или с помощью рекомбинантного человеческого фермента DICER для расщепления транскрибированных *in vitro* шаблонов дцРНК в пулы 20-, 21- или 23-битных дуплексных РНК, опосредующих РНКи. Молекулы миРНК можно конструировать с использованием любого способа, известного в данной области.

[0190] В одном аспекте вместо агента РНКи, представляющего собой интерферирующую рибонуклеиновую кислоту, например, миРНК или кшРНК, описанные выше, агент РНКи может кодировать интерферирующую рибонуклеиновую кислоту, например, кшРНК, как описано выше. Другими словами, агент РНКи может быть транскрипционным шаблоном интерферирующей рибонуклеиновой кислоты. Таким образом, агенты РНКи по настоящему изобретению могут также включать короткие шпилечные РНК (кшРНК) и экспрессирующие конструкции, разработанные для экспрессии кшРНК. Транскрипция кшРНК инициируется на промоторе полимеразы III (pol III) и, как полагают, завершается в положении 2 сайта терминации транскрипции 4-5-тимина. Считается, что при экспрессии кшРНК сворачиваются в структуру «стебель-петля» с 3'-UU-выступами; впоследствии концы этих кшРНК подвергаются процессингу, превращая кшРНК в миРНК-подобные молекулы длиной около 21-23 нуклеотидов (Brummelkamp et al., 2002; Lee et al., 2002, см. выше; Miyagishi et al., 2002; Paddison et al., 2002, см. выше; Paul et al., 2002, см. выше; Sui et al., 2002 см. выше; Yu et al., 2002, см. выше. Дополнительную информацию о разработке и использовании кшРНК можно найти в Интернете по следующим адресам:

BamHI_Strategy.pdf и katandin.cshl.org:9331/RNAi/docs/Web_version_of_PCR_strategy1.pdf).

[0191] Экспрессионные конструкции по настоящему изобретению включают любую конструкцию, подходящую для использования в соответствующей системе экспрессии, и включают, но не ограничиваются ими, ретровирусные векторы, линейные экспрессирующие кассеты, плазмиды и вирусные векторы или векторы, полученные из вирусов, известные в данной области техники. Такие экспрессирующие конструкции могут включать один или несколько индуцируемых промоторов, системы промоторов РНК Pol III, такие как промоторы мяРНК U6 или промоторы РНК-полимеразы III H1, или другие промоторы, известные в данной области. Конструкции могут включать одну или обе цепи миРНК. Экспрессионные конструкции, экспрессирующие обе цепи, также могут включать петлевые структуры, связывающие обе цепи, или каждая цепь может транскрибироваться отдельно с отдельных промоторов в одной и той же конструкции. Каждая цепь также может быть транскрибирована из отдельной экспрессирующей конструкции. (Tuschl, T., 2002, *см. выше*).

[0192] Синтетические миРНК можно доставлять в клетки способами, известными в данной области, включая трансфекцию катионных липосом и электропорацию. Чтобы добиться более долговременного подавления целевых генов (т.е. генов *flt1*) и облегчить доставку при определенных обстоятельствах, одну или более миРНК можно экспрессировать внутри клеток из рекомбинантных ДНК-конструкций. Такие способы экспрессии дуплексов миРНК внутри клеток из конструкций рекомбинантной ДНК, обеспечивающие долговременное подавление гена-мишени в клетках, известны в данной области техники, включая системы промоторов Pol III млекопитающих (например, системы промоторов H1 или U6/мяРНК (Tuschl, T., 2002, *см. выше*), способных экспрессировать функциональные двухцепочечные миРНК; (Bagella et al., 1998; Lee et al., 2002, *см. выше*; Miyagishi et al., 2002, *см. выше*; Paul et al., 2002, *см. выше*; Yu et al., 2002), *см. выше*; Sui et al., 2002, *см. выше*). Прекращение транскрипции под действием РНК Pol III происходит на участках четырех последовательных остатков Т в матрице ДНК, обеспечивая механизм завершения транскрипта миРНК на определенной последовательности. миРНК комплементарна последовательности целевого гена в ориентациях 5'-3' и 3'-5', и две цепи миРНК могут экспрессироваться в одной и той же конструкции или в отдельных конструкциях. Шпилечные миРНК, управляемые промотором мяРНК H1 или U6 и экспрессируемые в клетках, могут ингибировать экспрессию гена-мишени (Bagella et al., 1998; Lee et al., 2002, *см. выше*; Miyagishi et al., 2002, *см. выше*; Paul et al., 2002, *см. выше*; Yu et al., 2002), *см. выше*; Sui et al., 2002, *см. выше*). Конструкции, содержащие последовательность миРНК под контролем промотора T7, также создают функциональные миРНК при совместной трансфекции в клетки с вектором, экспрессирующим РНК-полимеразу T7 (Jacque et al., 2002, *см. выше*). Одна конструкция может содержать несколько последовательностей, кодирующих миРНК, например, несколько областей гена, кодирующего sFlt1, нацеленного на один и тот же ген

или несколько генов, и может управляться, например, отдельными сайтами промотора PolIII.

[0193] Клетки животных экспрессируют ряд некодирующих РНК длиной приблизительно 22 нуклеотида, называемых микроРНК (микроРНК), которые могут регулировать экспрессию генов на посттранскрипционном или трансляционном уровне во время развития животных. Одной общей особенностью микроРНК является то, что все они вырезаются из стволовой петли РНК-предшественника длиной примерно 70 нуклеотидов, вероятно, с помощью Dicer, фермента типа РНКазы III или его гомолога. Путем замены стволовых последовательностей предшественника микроРНК последовательностью, комплементарной целевой мРНК, можно использовать векторную конструкцию, которая экспрессирует сконструированный предшественник, для получения микроРНК для инициации РНКи против специфических мишеней мРНК в клетках млекопитающих (Zeng et al., 2002, см. выше). При экспрессии ДНК-векторами, содержащими промоторы полимеразы III, сконструированные микроРНК-шпильки могут подавлять экспрессию генов (McManus et al., 2002, см. выше). МикроРНК, нацеленные на полиморфизмы, также могут быть полезны для блокирования трансляции мутантных белков в отсутствие подавления генов, опосредованного микроРНК. Такие приложения могут быть полезны, например, в ситуациях, когда сконструированная микроРНК вызывает нецелевое подавление белка дикого типа.

[0194] Вирусно-опосредованные механизмы доставки также можно использовать для индукции специфического подавления целевых генов посредством экспрессии микроРНК, например, путем создания рекомбинантных аденовирусов, несущих микроРНК, под контролем транскрипции промотора РНК Pol II (Xia et al., 2002, см. выше). Инфицирование клеток HeLa этими рекомбинантными аденовирусами позволяет снизить экспрессию эндогенных генов-мишеней. Инъекция рекомбинантных аденовирусных векторов трансгенным мышам, экспрессирующим целевые гены микроРНК, приводит к снижению экспрессии целевых генов *in vivo*. *Id.* На животной модели электропорация целого эмбриона может эффективно доставлять синтетическую микроРНК в постимплантационные эмбрионы мыши (Calegari et al., 2002). У взрослых мышей эффективная доставка микроРНК может быть достигнута с помощью способа доставки «высокого давления», то есть быстрой инъекции (в течение 5 секунд) большого объема раствора, содержащего микроРНК, животному через хвостовую вену (Liu et al., 1999, выше; McCaffrey et al., 2002, см. выше; Lewis et al., 2002). Наночастицы и липосомы также можно использовать для доставки микроРНК животным. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (rAAV) и связанные с ними векторы можно использовать для доставки одной или более микроРНК в клетки, например, нервные клетки (например, клетки головного мозга) (патентные заявки США 2014/0296486, 2010/0186103, 2008/0269149, 2006/0078542 и 2005/0220766).

[0195] Композиции нуклеиновых кислот по изобретению включают как немодифицированные микроРНК, так и модифицированные микроРНК, известные в данной

области техники, такие как сшитые производные миРНК или производные, имеющие ненуклеотидные фрагменты, связанные, например, с их 3'- или 5'-концами. Модификация производных миРНК таким способом может улучшить клеточное поглощение или усилить клеточную направленную активность полученного производного миРНК по сравнению с соответствующей миРНК, полезна для отслеживания производного миРНК в клетке или улучшить стабильность производного миРНК по сравнению с соответствующим производным миРНК.

[0196] Сконструированные предшественники РНК, введенные в клетки или целые организмы, как описано в данном документе, будут приводить к продукции желаемой молекулы миРНК. Такая молекула миРНК затем будет ассоциироваться с эндогенными белковыми компонентами пути РНКи для связывания и нацеливания на конкретную последовательность мРНК для расщепления и разрушения. Таким образом, мРНК, на которую будет нацелена миРНК, полученная из сконструированного предшественника РНК, будет исчерпана из клетки или организма, что приведет к снижению концентрации белка, кодируемого этой мРНК, в клетке или организме. Предшественники РНК обычно представляют собой молекулы нуклеиновой кислоты, которые по отдельности кодируют либо одну цепь дцРНК, либо кодируют всю нуклеотидную последовательность шпильчатой петлевой структуры РНК.

[0197] Композиции нуклеиновых кислот по изобретению могут быть неконъюгированными или могут быть конъюгированы с другим фрагментом, таким как наночастица, для улучшения свойства композиций, например, фармакокинетического параметра, такого как абсорбция, эффективность, биодоступность и/или период полувыведения. Конъюгацию можно осуществить способами, известными в данной области, например, с использованием способов Lambert et al., *Drug Deliv. Rev.*: 47(1), 99-112 (2001) (описаны нуклеиновые кислоты, загруженные в наночастицы полиалкилцианоакрилата (РАСА)); Fattal et al., *J. Control Release* 53(1-3):137-43 (1998) (описаны нуклеиновые кислоты, связанные с наночастицами); Schwab et al., *Ann. Oncol.* 5 Suppl. 4:55-8 (1994) (описаны нуклеиновые кислоты, связанные с интеркалирующими агентами, гидрофобными группами, поликатионами или наночастицами РАСА); и Godard et al., *Eur. J. Biochem.* 232(2):404-10 (1995) (описаны нуклеиновые кислоты, связанные с наночастицами).

[0198] Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению также можно пометить с использованием любого способа, известного в данной области техники. Например, композиции нуклеиновых кислот можно пометить флуорофором, например, Су3, флуоресцеином или родамином. Мечение можно осуществлять с использованием набора, например, набора для мечения миРНК SILENCER™ (Ambion). Кроме того, миРНК можно пометить радиоактивным изотопом, например, с использованием ³Н, ³²Р или другого подходящего изотопа.

[0199] Более того, поскольку считается, что РНКи развивается через по меньшей мере одно промежуточное соединение одноцепочечной РНК, специалист в данной

области техники поймет, что оц-миРНК (например, антисмысловая цепь дц-миРНК) также могут быть сконструированы (например, для химического синтеза) получены (например, получены ферментативно) или экспрессированы (например, из вектора или плазмиды), как описано в данном документе, и использованы в соответствии с заявленными методиками. Более того, у беспозвоночных РНКи может эффективно запускаться длинными дцРНК (например, дцРНК длиной около 100-1000 нуклеотидов, предпочтительно около 200-500, например, длиной около 250, 300, 350, 400 или 450 нуклеотидов), действующими как эффекторы РНКи. (Brondani et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Dec. 4; 98(25):14428-33. Epub 2001 Nov. 27.)

III. Агенты сайленсинга РНК анти-sFlt1

[0200] В настоящем изобретении представлены агенты сайленсинга РНК анти-sFlt1 (например, миРНК и кшРНК), способы получения указанных агентов сайленсинга РНК и способы (например, исследовательские и/или терапевтические способы) использования указанных улучшенных агентов сайленсинга РНК (или их частей) для РНК сайленсинга одного или более белков sFLT1. Агенты сайленсинга РНК содержат антисмысловую цепь (или ее части), причем антисмысловая цепь имеет достаточную комплементарность гетерозиготному однонуклеотидному полиморфизму, чтобы опосредовать РНК-опосредованный механизм сайленсинга (например, РНКи).

а) Дизайн молекул миРНК против sFlt1

[0201] Молекула миРНК по изобретению представляет собой дуплекс, состоящий из смысловой цепи и комплементарной антисмысловой цепи, при этом антисмысловая цепь имеет достаточную комплементарность мРНК sFLT1 для опосредования РНКи. Предпочтительно молекула миРНК имеет длину около 10-50 или более нуклеотидов, т.е. каждая цепь содержит 10-50 нуклеотидов (или аналогов нуклеотидов). Более предпочтительно, молекула миРНК имеет длину около 16-30, например, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов в каждой цепи, при этом одна из цепей достаточно комплементарна целевой области. Предпочтительно, цепи выровнены так, что на концах цепей имеется по меньшей мере 1, 2 или 3 основания, которые не выравниваются (т.е. для которых нет комплементарных оснований в противоположной цепи), так что при отжиге цепей на одном или обоих концах дуплекса образуется выступ из 1, 2 или 3 остатков. Предпочтительно молекула миРНК имеет длину около 10-50 или более нуклеотидов, т.е. каждая цепь содержит 10-50 нуклеотидов (или аналогов нуклеотидов). Более предпочтительно, молекула миРНК имеет длину около 16-30, например, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов в каждой цепи, при этом одна из цепей по существу комплементарна целевой последовательности, а другая цепь идентична или практически идентична первой цепи.

[0202] Как правило, миРНК могут быть сконструированы с использованием любого способа, известного в данной области, например, с использованием следующего протокола:

[0203] 1. миРНК должна быть специфичной в отношении целевой

последовательности, например, последовательности-мишени. В одном варианте осуществления целевая последовательность обнаружена в растворимой мРНК Flt1, но не в полноразмерной мРНК Flt. В другом варианте осуществления целевая последовательность обнаружена как в растворимой мРНК Flt1, так и в полноразмерной мРНК Flt. В другом варианте осуществления целевая последовательность обнаружена в полноразмерной мРНК Flt. Первая цепь должна быть комплементарна целевой последовательности, а другая цепь по существу комплементарна первой цепи. В одном варианте осуществления целевая последовательность кодируется в интронной области одной или более последовательностей растворимой мРНК Flt. Иллюстрационные целевые последовательности соответствуют одному или более интронным областям гена-мишени. Расщепление мРНК по этим сайтам должно исключить трансляцию соответствующего растворимого белка, но не полноразмерного белка. Целевые последовательности из других областей гена flt также подходят для нацеливания. Смысловая цепь конструируется на основе целевой последовательности. Кроме того, миРНК с более низким содержанием G/C (35-55%) могут быть более активными, чем те, у которых содержание G/C выше 55%. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретение включает молекулы нуклеиновой кислоты, имеющие содержание G/C 35-55%.

[0204] 2. Смысловая цепь миРНК конструируется на основе последовательности выбранного сайта-мишени. Предпочтительно смысловая цепь включает от около 19 до 25 нуклеотидов, например, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. Более предпочтительно смысловая цепь включает 21, 22 или 23 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь включает 16 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь включает 17 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь включает 18 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь включает 19 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь включает 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь включает 21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь включает 22 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь включает 23 нуклеотида. Однако для специалиста в данной области техники будет понятно, что миРНК, имеющие длину менее 19 нуклеотидов или более 25 нуклеотидов, также могут функционировать для опосредования РНКи. Соответственно, миРНК такой длины также входят в объем настоящего изобретения при условии, что они сохраняют способность опосредовать РНКи. Было продемонстрировано, что более длинные агенты, подавляющие РНК, вызывают реакцию интерферона или протеинкиназы R (PKR) в некоторых клетках млекопитающих, что может быть нежелательным. Предпочтительно, чтобы агенты, подавляющие РНК, по настоящему изобретению не вызывали PKR-ответа (т.е. имели достаточно короткую длину). Однако более длинные агенты, подавляющие РНК, могут быть полезны, например, в типах клеток, неспособных генерировать ответ PRK, или в ситуациях, когда ответ PKR снижается или подавляется альтернативными способами.

[0205] Молекулы миРНК по изобретению обладают достаточной комплементарностью целевой последовательности, чтобы миРНК могла опосредовать РНКи. В целом, предпочтительными являются миРНК, содержащие нуклеотидные последовательности, достаточно идентичные участку целевой последовательности гена-мишени для осуществления RISC-опосредованного расщепления гена-мишени. Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления смысловая цепь миРНК сконструирована таким образом, чтобы иметь последовательность, в достаточной степени идентичную части мишени. Например, смысловая цепь может иметь 100% идентичность целевому сайту. Однако, 100% идентичность не требуется. Идентичность более 80%, например, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или даже 100%, между смысловой цепью и целевой последовательностью РНК является предпочтительной. Преимуществом изобретения является возможность допускать определенные вариации последовательности для повышения эффективности и специфичности РНКи. В одном варианте осуществления смысловая цепь имеет 4, 3, 2, 1 или 0 несовпадающих нуклеотидов с целевой областью, такой как целевая область, которая отличается по меньшей мере на одну пару оснований между растворимым *flt1* и полноразмерным аллелем *flt1*, например, целевой областью, включающей мутацию приобретения функции, а другая цепь идентична или практически идентична первой цепи. Более того, последовательности миРНК с небольшими вставками или делециями в 1 или 2 нуклеотида также могут быть эффективными для опосредования РНКи. В качестве альтернативы для ингибирования могут быть эффективны последовательности миРНК с заменами или вставками аналогов нуклеотидов.

[0206] Идентичность последовательностей можно определить с помощью алгоритмов сравнения последовательностей и выравнивания, известных в данной области техники. Чтобы определить процент идентичности двух последовательностей нуклеиновой кислоты (или двух аминокислотных последовательностей), последовательности выравнивают для целей оптимального сравнения (например, в первую последовательность или вторую последовательность можно вводить гэпы для оптимального выравнивания). Затем сравнивают нуклеотиды (или аминокислотные остатки) в соответствующих положениях нуклеотидов (или аминокислот). Когда положение в первой последовательности занято тем же остатком, что и соответствующее положение во второй последовательности, тогда молекулы в этом положении идентичны. Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от количества идентичных позиций, разделяемых последовательностями (т.е. % гомологии=количество идентичных позиций/общее количество позиций x 100), что необязательно снижает оценку за количество введенных гэпов и/или длину введенных гэпов.

[0207] Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно выполнить с использованием математического алгоритма. В одном варианте осуществления выравнивание происходит по определенной части последовательности, выровненной с достаточной степенью

идентичности, но не по частям, имеющим низкую степень идентичности (т.е. локальное выравнивание). Предпочтительным неограничивающим примером алгоритма локального выравнивания, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, модифицированный, как у in Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77. Такой алгоритм включен в программы BLAST (версия 2.0) Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10.

[0208] В другом варианте осуществления выравнивание оптимизируют путем введения соответствующих гэпов, и процент идентичности определяют по длине выровненных последовательностей (т.е. выравнивание с гэпами). Чтобы получить выравнивания с гэпами для целей сравнения, можно использовать Gapped BLAST, как описано Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. В другом варианте осуществления выравнивания оптимизируют путем введения соответствующих гэпов и определения процента идентичности по всей длине выровненных последовательностей (т.е. глобального выравнивания). Предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для глобального сравнения последовательностей, является алгоритм Майерса и Миллера, CABIOS (1989). Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программного обеспечения для выравнивания последовательностей GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу весовых остатков PAM120, штраф за длину гэпа 12, и штраф за гэп в последовательности 4.

[0209] 3. Антисмысловая или направляющая цепь мРНК обычно имеет ту же длину, что и смысловая цепь, и включает комплементарные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая или направляющая цепь длиннее смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая или направляющая цепь короче смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая или направляющая цепь включает от около 19 до 25 нуклеотидов, например, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая или направляющая цепь включает 21, 22 или 23 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая или направляющая цепь включает 16 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая или направляющая цепь включает 17 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая или направляющая цепь включает 18 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая или направляющая цепь включает 19 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая или направляющая цепь включает 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая или направляющая цепь включает 21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая или направляющая цепь включает 22 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая или направляющая цепь включает 23 нуклеотида.

[0210] В одном варианте осуществления направляющая и смысловая цепи

являются полностью комплементарными, т.е. цепи имеют тупые концы при выравнивании или отжиге. В другом варианте осуществления цепи миРНК могут быть спарены таким образом, чтобы иметь 3'-выступающий конец, составляющий 1-4, например, 2 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления 3'-выступающий конец составляет 1 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления 3'-выступающий конец составляет 2 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления 3'-выступающий конец составляет 3 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления 3'-выступающий конец составляет 4 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления 3'-выступающий конец составляет 5 нуклеотидов. Выступающие концы могут содержать (или состоять из) нуклеотиды, соответствующие последовательности гена-мишени (или ее комплементу). Альтернативно, выступающие концы могут содержать (или состоять из них) дезоксирибонуклеотиды, например dT, или аналоги нуклеотидов, или другой подходящий ненуклеотидный материал. Таким образом, в другом варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты могут иметь 3'-выступающий конец из 2 нуклеотидов, таких как TT. Выступающие нуклеотиды могут представлять собой либо РНК, либо ДНК. Как отмечалось выше, желательно выбрать целевую область, в которой ошибочное спаривание мутант:дикий тип представляет собой ошибочное спаривание пурин:пурин.

[0211] 4. Используя любой способ, известный в данной области техники, сравните потенциальные мишени с соответствующей базой данных геномов (человека, мыши, крысы и т. д.) и исключите из рассмотрения любые целевые последовательности, обладающие значительной гомологией с другими кодирующими последовательностями. Один из таких способов поиска гомологии последовательностей известен как BLAST, который доступен на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации.

[0212] 5. Выберите одну или более последовательностей, соответствующих вашим критериям оценки.

[0213] Дополнительную общую информацию о разработке и использовании миРНК можно найти в «Руководстве пользователя миРНК», доступном на веб-сайте Института биофизики Макса Планка.

[0214] Альтернативно, миРНК можно функционально определить как нуклеотидную последовательность (или олигонуклеотидную последовательность), которая способна гибридизоваться с целевой последовательностью (например, 400 mM NaCl, 40 mM PIPES, pH 6,4, 1 mM ЭДТА, гибридизация при 50°C or 70°C в течение 12-16 часов, после чего следует промывание). Дополнительные предпочтительные условия гибридизации включают гибридизацию при 70°C в 1xSSC или 50°C в 1xSSC, 50% формамиде с последующим промыванием при 70°C в 0,3xSSC или гибридизацию при 70°C в 4xSSC или 50°C в 4xSSC, 50% формамиде с последующим промыванием при 67 °C в 1xSSC. Температура гибридизации для гибридов, длина которых, как ожидается, будет менее 50 пар оснований, должна быть на 5-10°C ниже, чем температура плавления (T_m) гибрида, где T_m определяется в соответствии со следующими уравнениями. Для гибридов длиной менее 18 пар оснований $T_m(^{\circ}C) = 2(\# A+T) + 4(\# \text{ оснований } G+C)$. Для гибридов

длиной от 18 до 49 пар оснований $Tm(^{\circ}C)=81,5+16,6(\log 10[Na^{+}])+0,41(\% G+C)-(600/N)$, где N представляет собой количество оснований в гибриде, $[Na^{+}]$ представляет собой концентрацию ионов натрия в буфере гибридизации ($[Na^{+}]$ для $1 \times SSC=0,165 M$). Дополнительные примеры условий жесткости для гибридизации полинуклеотидов представлены в Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., chapters 9 and 11, and *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, F. M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4, включенные в данный документ посредством ссылки.

[0215] Отрицательные контрольные миРНК должны иметь тот же нуклеотидный состав, что и выбранная миРНК, но без значительной комплементарности последовательностей соответствующему геному. Такие отрицательные контроли могут быть созданы путем статистического скремблирования нуклеотидной последовательности выбранной миРНК. Поиск гомологии может быть проведен для того, чтобы убедиться, что отрицательный контроль не имеет гомологии с любым другим геном в соответствующем геноме. Кроме того, можно создать миРНК отрицательного контроля путем введения в последовательность одной или более ошибочных пар оснований.

[0216] 6. Чтобы проверить эффективность разрушения миРНК целевых мРНК (например, мРНК sFLT1, соответствующей растворимому FLT1), миРНК можно инкубировать целевой кДНК (например, кДНК flt1) в системе экспрессии мРНК *in vitro* на основе *дрозофилы*. Вновь синтезированные целевые мРНК, меченные радиоактивным изотопом ^{32}P (например, мРНК sFlt1), обнаруживаются автордиографически на агарозном геле. Наличие расщепленной целевой мРНК указывает на нуклеазную активность мРНК. Подходящие контроли включают пропуск миРНК и использование нецелевой кДНК. В качестве альтернативы выбирают контрольные миРНК, имеющие тот же нуклеотидный состав, что и выбранная миРНК, но не обладающие значительной комплементарностью последовательности соответствующему гену-мишени. Такие отрицательные контроли могут быть созданы путем статистического скремблирования нуклеотидной последовательности выбранной миРНК. Поиск гомологии может быть проведен для того, чтобы убедиться, что отрицательный контроль не имеет гомологии с любым другим геном в соответствующем геноме. Кроме того, можно создать миРНК отрицательного контроля путем введения в последовательность одной или более ошибочных пар оснований.

[0217] миРНК анти-sflt1 могут быть сконструированы для нацеливания на любую из целевых последовательностей, описанных выше. Указанные миРНК содержат антисмысловую цепь, которая достаточно комплементарна целевой последовательности, чтобы опосредовать сайленсинг целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления агент, подавляющий РНК, представляет собой миРНК.

[0218] Участки комплементации миРНК-мРНК выбираются так, чтобы обеспечить оптимальную специфичность мРНК и максимальное расщепление мРНК.

b) Молекулы, подобные миРНК

[0219] Молекулы, подобные миРНК по настоящему изобретению имеют последовательность (т.е. имеют цепь, имеющую последовательность), которая «достаточно комплементарна» целевой последовательности мРНК *sflt1* для управления подавлением гена либо посредством РНКи, либо посредством трансляционной репрессии. Молекулы, подобные миРНК сконструированы так же, как и молекулы миРНК, но степень идентичности последовательностей между смысловой цепью и целевой РНК приближается к той, которая наблюдается между микроРНК и ее мишенью. В общем, поскольку степень идентичности последовательностей между последовательностью микроРНК и соответствующей последовательностью гена-мишени снижается, тенденция опосредовать посттранскрипционное подавление генов посредством трансляционной репрессии, а не РНКи, увеличивается. Следовательно, в альтернативном варианте осуществления, где желательно посттранскрипционное подавление гена путем трансляционной репрессии гена-мишени, последовательность микроРНК имеет частичную комплементарность с последовательностью гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательность микроРНК имеет частичную комплементарность с одной или более короткими последовательностями (сайтами комплементарности), диспергированными внутри целевой мРНК (например, в пределах 3'-UTR целевой мРНК) (Hutvagner and Zamore, *Science*, 2002; Zeng et al., *Mol. Cell*, 2002; Zeng et al., *RNA*, 2003; Doench et al., *Genes & Dev.*, 2003). Поскольку механизм трансляционной репрессии является кооперативным, в некоторых вариантах осуществления изобретения мишенью могут быть несколько сайтов комплементации (например, 2, 3, 4, 5 или 6).

[0220] Способность миРНК-подобного дуплекса опосредовать РНКи или трансляционную реессию можно предсказать по распределению неидентичных нуклеотидов между последовательностью гена-мишени и нуклеотидной последовательностью сайленсирующего агента в сайте комплементарности. В одном варианте осуществления, когда желательно подавление генов путем трансляционной репрессии, по меньшей мере, один неидентичный нуклеотид присутствует в центральной части сайта комплементарности, так что дуплекс, образованный направляющей цепью миРНК и целевой мРНК, содержит центральную «выпуклость» (Doench JG et al., *Genes & Dev.*, 2003). В другом варианте осуществления вводятся 2, 3, 4, 5 или 6 смежных или несмежных неидентичных нуклеотидов. Неидентичный нуклеотид может быть выбран таким образом, чтобы он образовывал неоднозначную пару оснований (например, G:U) или ошибочную пару оснований (G:A, C:A, C:U, G:G, A:A, C:C, U:U). В следующем предпочтительном варианте осуществления «выпуклость» находится в положениях нуклеотидов 12 и 13 от 5'-конца молекулы миРНК.

с) Молекулы короткой шпилечной РНК (кшРНК)

[0221] В некоторых характерных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены кшРНК, способные опосредовать подавление РНК целевой последовательности *sflt1* с повышенной селективностью. В отличие от миРНК, кшРНК

имитируют естественные предшественники микроРНК (микроРНК) и входят в верхнюю часть пути подавления генов. По этой причине считается, что кшРНК более эффективно опосредуют подавление генов, проходя через весь естественный путь подавления генов.

[0222] МикроРНК представляют собой некодирующие РНК длиной примерно 22 нуклеотида, которые могут регулировать экспрессию генов на посттранскрипционном или трансляционном уровне во время развития растений и животных. Одной общей особенностью микроРНК является то, что все они вырезаются из стеблевой петли РНК-предшественника длиной примерно 70 нуклеотидов, называемой пре-микроРНК, вероятно, с помощью Дайсера, фермента типа РНКазы III или его гомолога. Встречающиеся в природе предшественники микроРНК (пре-микроРНК) имеют одну цепь, которая образует дуплексный стебель, включающий две части, которые обычно являются комплементарными, и петлю, соединяющую две части стебля. В типичных пре-микроРНК стебель включает одну или более выпуклостей, например, лишние нуклеотиды, которые создают однонуклеотидную «петлю» в одной части стебля, и/или один или несколько неспаренных нуклеотидов, которые создают гэп в гибридизации двух частей стебля друг с другом. Короткие шпилечные РНК или сконструированные предшественники РНК по настоящему изобретению представляют собой искусственные конструкции на основе этих встречающихся в природе пре-микроРНК, но которые сконструированы для доставки желаемых агентов, подавляющих РНК (например, миРНК по настоящему изобретению). Путем замены стволых последовательностей пре-микроРНК последовательностью, комплементарной целевой мРНК, образуется кшРНК. кшРНК процессируется по всему пути подавления генов клетки, тем самым эффективно опосредуя РНКи.

[0223] Необходимые элементы молекулы кшРНК включают первую часть и вторую часть, обладающие достаточной комплементарностью для отжига или гибридизации с образованием дуплекса или двухцепочечной части стебля. Эти две части не обязательно должны быть полностью или идеально дополняющими друг друга. Первая и вторая части «стебля» соединены частью, имеющей последовательность, которая имеет недостаточную комплементарность последовательности для отжига или гибридизации с другими частями кшРНК. Эта последняя часть называется «петлей» в молекуле кшРНК. Молекулы кшРНК подвергаются обработке с образованием миРНК. кшРНК также могут включать в себя одну или более выпуклостей, т.е. дополнительные нуклеотиды, которые создают небольшую нуклеотидную «петлю» в части стебля, например, петлю из одного, двух или трех нуклеотидов. Части стебля могут иметь одинаковую длину или одна часть может включать выступ, например, из 1-5 нуклеотидов. Выступающие нуклеотиды могут включать, например, урацилы (Us), например, все Us. Такие Us, в частности, кодируются тимидинами (Ts) в ДНК, кодирующей кшРНК, которые сигнализируют о прекращении транскрипции.

[0224] В кшРНК (или сконструированных РНК-предшественниках) по настоящему изобретению одна часть дуплексного стебля представляет собой последовательность

нуклеиновой кислоты, которая является комплементарной (или антисмысловой) целевой последовательности sFlt1. Предпочтительно, чтобы одна цепь стеблевой части кшРНК была достаточно комплементарна (например, антисмысловая) целевой последовательности РНК (например, мРНК), чтобы опосредовать деградацию или расщепление указанной целевой РНК посредством РНК-интерференции (РНКи). Таким образом, сконструированные предшественники РНК включают дуплексный стебель с двумя частями и петлю, соединяющую две части стебля. Антисмысловая часть может находиться на 5'- или 3'-конце стебля. Длина стеблевых частей кшРНК предпочтительно составляет от около 15 до около 50 нуклеотидов. Предпочтительно две части стебля имеют длину от около 18 или 19 до около 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 37, 38, 39 или 40 или более нуклеотидов. В предпочтительных вариантах осуществления длина участков стебля должна составлять 21 нуклеотид или более. При использовании в клетках млекопитающих длина частей стебля должна быть менее, чем около 30 нуклеотидов, чтобы избежать провоцирования неспецифических реакций, таких как путь интерферона. В клетках немлекопитающих стебель может иметь длину более 30 нуклеотидов. Фактически, стебель может включать в себя гораздо более крупные участки, комплементарные целевой мРНК (вплоть до всей мРНК включительно). На самом деле, часть стебля может включать гораздо большие участки, комплементарные целевой мРНК (вплоть до всей мРНК).

[0225] Две части дуплексного стебля должны быть достаточно комплементарны, чтобы гибридизоваться и образовать дуплексный стебель. Таким образом, две части могут быть, но не обязательно должны быть полностью или идеально комплементарны. Кроме того, два участка стебля могут быть одинаковой длины, или один из участков может включать 1, 2, 3 или 4 выступающих нуклеотида. Выступающие нуклеотиды могут включать, например, урацилы (Us), например, все Us. Петля в кшРНК или сконструированных предшественниках РНК может отличаться от природных последовательностей пре-микроРНК за счет модификации последовательности петли для увеличения или уменьшения количества парных нуклеотидов или замены всей или части последовательности петли тетрапетлей или другими последовательностями петель. Таким образом, петля в кшРНК или сконструированных предшественниках РНК может иметь длину 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более, например, 15 или 20 или более нуклеотидов.

[0226] Петля в кшРНК или сконструированных предшественниках РНК может отличаться от природных последовательностей пре-микроРНК за счет модификации последовательности петли для увеличения или уменьшения количества парных нуклеотидов или замены всей или части последовательности петли тетрапетлей или другими последовательностями петель. Таким образом, длина петлевой части в кшРНК может составлять от 2 до 20 нуклеотидов, т.е. около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более, например, 15 или 20, или более нуклеотидов в длину. Предпочтительная петля состоит или включает в себя последовательность "тетрапетля". Типичные последовательности тетрапетли включают, но не ограничиваются ими, последовательности GNRA, где N представляет собой любой нуклеотид, а R представляет собой пуриновый нуклеотид,

GGGG и UUUU.

[0227] В некоторых вариантах осуществления кшРНК по изобретению включают последовательности желаемой молекулы миРНК, описанные выше. В других вариантах осуществления последовательность антисмысловой части кшРНК может быть сконструирована по существу, как описано выше, или в целом путем выбора последовательности из 18, 19, 20, 21 нуклеотида или более длинной последовательности из целевой РНК (например, мРНК *sflt1*), например, из области 100-200 или 300 нуклеотидов выше или ниже начала трансляции. В общем, последовательность может быть выбрана из любой части целевой РНК (например, мРНК), включая интронную область, 5'-UTR (нетранслируемую область), кодирующую последовательность или 3'-UTR, при условии, что указанная часть находится на расстоянии от сайта мутации приобретения функции. Эта последовательность может необязательно следовать сразу за областью гена-мишени, содержащей два соседних нуклеотида AA. Последние два нуклеотида нуклеотидной последовательности могут быть выбраны как UU. Эта последовательность из около 21 нуклеотида используется для создания одной части дуплексного стебля в кшРНК. Эта последовательность может заменять часть ствола последовательности пре-миРНК дикого типа, например, ферментативно, или включаться в полную синтезируемую последовательность. Эта последовательность может замещать часть ствола последовательности пре-миРНК дикого типа, например, ферментативно, или включаться в полную последовательность, которая синтезируется. Например, можно синтезировать ДНК-олигонуклеотиды, которые кодируют весь сконструированный по типу стеблевая петля предшественник РНК, или которые кодируют только часть, которая будет вставлена в дуплексный стебель предшественника, и с помощью ферментов рестрикции создать конструкцию предшественника РНК, например, из пре-микроРНК дикого типа.

[0228] Сконструированные предшественники РНК включают в дуплексный стебель 21-22 или около того нуклеотидных последовательностей миРНК или миРНК-подобного дуплекса, которые желательно получить *in vivo*. Таким образом, стволовая часть сконструированного предшественника РНК включает по меньшей мере 18 или 19 пар нуклеотидов, соответствующих последовательности экзонной части гена, экспрессию которого необходимо снизить или ингибировать. Два 3'-нуклеотида, фланкирующие эту область стебля, выбраны таким образом, чтобы максимизировать продукцию миРНК из сконструированного предшественника РНК и максимизировать эффективность полученной миРНК в нацеливании на соответствующую мРНК для трансляционной репрессии или разрушения с помощью РНКи *in vivo* и *in vitro*.

[0229] В некоторых вариантах осуществления кшРНК по изобретению включают последовательности микроРНК, необязательно последовательности микроРНК с модифицированными концами, для усиления входа в RISC. Последовательность микроРНК может быть сходной или идентичной последовательности любой встречающейся в природе микроРНК (см., например, The miRNA Registry; Griffiths-Jones

S, *Nuc. Acids Res.*, 2004). На сегодняшний день идентифицировано более тысячи природных микроРНК, и считается, что вместе они составляют около 1% всех предсказанных генов в геноме. Многие природные микроРНК группируются вместе в интронах пре-мРНК и могут быть идентифицированы *in silico* с помощью поиска на основе гомологии (Pasquinelli et al., 2000; Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee и Ambros, 2001) или компьютерных алгоритмов (например, MiRScan, MiRSeeker), которые предсказывают способность гена-кандидата микроРНК формировать структуру стеблевой петли пре-мРНК (Grad et al., *Mol. Cell.*, 2003; Lim et al., *Genes Dev.*, 2003; Lim et al., *Science*, 2003; Lai EC et al., *Genome Bio.*, 2003). Онлайн-реестр предоставляет доступную для поиска базу данных всех опубликованных последовательностей микроРНК (The miRNA Registry at the Sanger Institute website; Griffiths-Jones S, *Nuc. Acids Res.*, 2004). Типичные природные микроРНК включают *lin-4*, *let-7*, *miR-10*, *mirR-15*, *miR-16*, *miR-168*, *miR-175*, *miR-196* и их гомологи, а также другие природные микроРНК человека и некоторых модельных организмов, включая *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *zebrafish*, *Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus*, and *Rattus norvegicus* описанные в международной публикации РСТ № WO 03/029459.

[0230] Встречающиеся в природе микроРНК экспрессируются эндогенными генами *in vivo* и процессируются из шпильки или предшественника «стебель-петля» (пре-микроРНК или при-микроРНК) с помощью Дайсера или других РНКаз (Lagos-Quintana et al., *Science*, 2001; Lau et al., *Science*, 2001; Lee and Ambros, *Science*, 2001; Lagos-Quintana et al., *Curr. Biol.*, 2002; Mourelatos et al., *Genes Dev.*, 2002; Reinhart et al., *Science*, 2002; Ambros et al., *Curr. Biol.*, 2003; Brennecke et al., 2003; Lagos-Quintana et al., *RNA*, 2003; Lim et al., *Genes Dev.*, 2003; Lim et al., *Science*, 2003). микроРНК могут временно существовать *in vivo* в виде двухцепочечного дуплекса, но только одна цепь захватывается комплексом RISC, чтобы направлять сайленсинг генов. Некоторые микроРНК, например, растительные микроРНК, обладают идеальной или почти идеальной комплементарностью к своим мРНК-мишеням, и, следовательно, прямым расщеплением мРНК-мишеней. Другие микроРНК имеют не идеальную комплементарность своим мРНК-мишеням и, следовательно, прямую трансляционную репрессию целевых мРНК. Считается, что степень комплементарности между микроРНК и ее целевой мРНК определяет механизм ее действия. Например, идеальная или почти идеальная комплементарность между микроРНК и ее мРНК-мишенью является предиктором механизма расщепления (Yekta et al., *Science*, 2004), тогда как менее чем идеальная комплементарность является предиктором механизма трансляционной репрессии. В конкретных вариантах осуществления последовательность микроРНК представляет собой последовательность природной микроРНК, аберрантная экспрессия или активность которой коррелирует с расстройством микроРНК.

d) Двухфункциональные олигонуклеотидные привязки

[0231] В других вариантах осуществления агенты сайленсинга РНК по настоящему изобретению включают двухфункциональные олигонуклеотидные привязки, полезные для

межклеточного рекрутирования микроРНК. Клетки животных экспрессируют ряд микроРНК, некодирующих РНК длиной примерно 22 нуклеотида, которые могут регулировать экспрессию генов на посттранскрипционном или трансляционном уровне. Связывая микроРНК, связанную с RISC, и рекрутируя ее на целевую мРНК, двухфункциональная олигонуклеотидная привязка может подавлять экспрессию генов, участвующих, например, в атеросклеротическом процессе. Использование олигонуклеотидных привязок дает несколько преимуществ по сравнению с существующими способами подавления экспрессии определенного гена. Во-первых, описанные в данном документе способы позволяют эндогенной молекуле (часто присутствующей в избытке) микроРНК опосредовать сайленсинг РНК. Соответственно, описанные здесь способы устраняют необходимость введения чужеродных молекул (например, миРНК) для обеспечения сайленсинга РНК. Во-вторых, агенты, подавляющие РНК, и, в частности, связывающий фрагмент (например, олигонуклеотиды, такие как 2'-О-метилолигонуклеотид), можно сделать стабильными и устойчивыми к активности нуклеазы. В результате привязки по настоящему изобретению могут быть разработаны для прямой доставки, устраняя необходимость непрямо́й доставки (например, вирусной) молекулы-предшественника или плазмиды, предназначенной для создания желаемого агента внутри клетки. В-третьих, привязки и их соответствующие фрагменты могут быть сконструированы так, чтобы соответствовать конкретным участкам мРНК и конкретным микроРНК. Конструкции могут быть специфичными для клеток и генных продуктов. В-четвертых, раскрытые в данном документе способы оставляют мРНК нетронутой, что позволяет специалисту в данной области блокировать синтез белка короткими импульсами, используя собственные механизмы клетки. В результате эти способы сайленсинга РНК являются высокорегулируемыми.

[0232] Двойные функциональные олигонуклеотидные привязки («привязки») по изобретению сконструированы таким образом, что они привлекают микроРНК (например, эндогенные клеточные микроРНК) к целевой мРНК, чтобы индуцировать модуляцию интересующего гена. В предпочтительных вариантах осуществления привязки имеют формулу T-L-μ, где T представляет собой нацеливающий фрагмент мРНК, L представляет собой связывающий фрагмент, а μ представляет собой фрагмент, рекрутирующий микроРНК. Любой один или более фрагментов могут быть двухцепочечными. Предпочтительно, однако, чтобы каждый фрагмент был одноцепочечным.

[0233] Фрагменты внутри привязок могут быть расположены или связаны (в направлении от 5' к 3'), как показано в формуле T-L-μ (т.е. 3'-конец нацеливающего фрагмента связан с 5'-концом связывающего фрагмента и 3'-конец связывающего фрагмента связан с 5'-концом рекрутирующего фрагмента миРНК). Альтернативно, фрагменты могут быть расположены или связаны в привязке следующим образом: μ-T-L (т.е. 3'-конец рекрутирующего фрагмента миРНК связан с 5'-концом связывающего фрагмента, а 3'-конец связывающего фрагмента связан к 5'-концу нацеливающего фрагмента).

[0234] Фрагмент, нацеливающий мРНК, описанный выше, способен захватывать конкретную мРНК-мишень. Согласно изобретению экспрессия целевой мРНК нежелательна и, таким образом, желательна трансляционная репрессия мРНК. Фрагмент, нацеливающий мРНК, должен иметь достаточный размер для эффективного связывания мРНК-мишени. Длина нацеливающего фрагмента будет значительно варьироваться в зависимости, отчасти, от длины целевой мРНК и степени комплементарности между целевой мРНК и нацеливающим фрагментом. В различных вариантах осуществления нацеливающий фрагмент составляет менее, чем около 200, 100, 50, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6. или 5 нуклеотидов в длину. В конкретном варианте осуществления нацеливающий фрагмент имеет длину от около 15 до около 25 нуклеотидов.

[0235] Рекрутинговый фрагмент микроРНК, как описано выше, способен связываться с микроРНК. Согласно изобретению микроРНК может представлять собой любую микроРНК, способную репрессировать целевую мРНК (например, одну или несколько мРНК *sft1*). Сообщается, что млекопитающие имеют более 250 эндогенных микроРНК (Lagos-Quintana et al. (2002) *Current Biol.* 12:735-739; Lagos-Quintana et al. (2001) *Science* 294:858-862; и Lim et al. (2003) *Наука* 299:1540). В различных вариантах осуществления микроРНК может представлять собой любую микроРНК, распознаваемую в данной области техники.

[0236] Связывающий фрагмент представляет собой любой агент, способный связывать нацеливающие фрагменты таким образом, что сохраняется активность нацеливающих фрагментов. Связывающие фрагменты предпочтительно представляют собой олигонуклеотидные фрагменты, содержащие достаточное количество нуклеотидов, так что нацеливающие агенты могут в достаточной степени взаимодействовать со своими соответствующими мишенями. Связывающие фрагменты имеют небольшую гомологию или вообще не имеют гомологии с последовательностями клеточных мРНК или микроРНК. Типичные связывающие фрагменты включают один или более 2'-О-метилнуклеотидов, например, 2'-β-метиладенозин, 2'-О-метилтимидин, 2'-О-метилгуанозин или 2'-О-метилуридин.

е) Олигонуклеотиды, подавляющие гены

[0237] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления экспрессию гена (т.е. экспрессию гена *sft1*) можно модулировать с помощью соединений на основе олигонуклеотидов, содержащих два или более одноцепочечных антисмысловых олигонуклеотидов, которые связаны через свои 5'-концы, что обеспечивает наличие двух или более доступных 3'-концов для эффективного ингибирования или снижения экспрессии гена *sft1*. Такие связанные олигонуклеотиды также известны как олигонуклеотиды, сайленсирующие гены (GSO). (См., например, патент США 8431544, принадлежащий Idera Pharmaceuticals, Inc., включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.)

[0238] Связь на 5'-концах GSO не зависит от других олигонуклеотидных связей и

может осуществляться напрямую через 5', 3' или 2' гидроксильные группы или опосредованно через ненуклеотидный линкер или нуклеозид, используя либо 2' или 3' гидроксильные положения нуклеозида. Связи могут также использовать функционализированный сахар или азотистое основание 5'-концевого нуклеотида.

[0239] GSO могут содержать две идентичные или разные последовательности, конъюгированные на своих 5'-5'-концах через фосфодиэфирный, тиофосфатный или ненуклеотидный линкер. Такие соединения могут содержать от 15 до 27 нуклеотидов, которые комплементарны определенным участкам мРНК-мишеней, представляющих интерес для антисмысловой регуляции генных продуктов. GSO, которые содержат идентичные последовательности, могут связываться с определенной мРНК посредством взаимодействий водородных связей Уотсона-Крика и ингибировать экспрессию белка. GSO, которые содержат разные последовательности, способны связываться с двумя или более различными областями одной или более мишеней мРНК и ингибировать экспрессию белка. Такие соединения состоят из гетеронуклеотидных последовательностей, комплементарных целевой мРНК, и образуют стабильные дуплексные структуры посредством водородных связей Уотсона-Крика. При определенных условиях GSO, содержащие два свободных 3'-конца (5'-5'-присоединенные антисмысловые), могут быть более мощными ингибиторами экспрессии генов, чем те, которые содержат один свободный 3'-конец или не содержат свободного 3'-конца.

[0240] В некоторых вариантах осуществления ненуклеотидный линкер представляет собой глицерин или гомолог глицерина формулы $\text{HO}-(\text{CH}_2)_o-\text{CH}(\text{OH})-(\text{CH}_2)_p-\text{OH}$, где o и p независимо представляют собой целые числа от 1 до около 6, от 1 до около 4 или от 1 до около 3. В некоторых других вариантах осуществления ненуклеотидный линкер представляет собой производное 1,3-диамино-2-гидроксипропана. Некоторые такие производные имеют формулу $\text{HO}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NHC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$, где m представляет собой целое число от 0 до около 10, от 0 до около 6, от 2 до около 6 или от 2 до около 4.

[0241] Некоторые ненуклеотидные линкеры допускают присоединение более двух компонентов GSO. Например, ненуклеотидный линкер глицерин имеет три гидроксильные группы, к которым могут ковалентно присоединяться компоненты GSO. Поэтому некоторые соединения по настоящему изобретению на основе олигонуклеотидов содержат два или более олигонуклеотидов, связанных с нуклеотидным или ненуклеотидным линкером. Такие олигонуклеотиды согласно изобретению называются «разветвленными».

[0242] В некоторых вариантах осуществления GSO имеют длину по меньшей мере 14 нуклеотидов. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления GSO имеют длину от 15 до 40 нуклеотидов или от 20 до 30 нуклеотидов. Таким образом, составляющие GSO олигонуклеотиды могут независимо друг от друга иметь длину 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 нуклеотидов.

[0243] Эти олигонуклеотиды можно получить признанными в данной области способами, такими как химия фосфорамидатов или Н-фосфонатов, которую можно осуществлять вручную или с помощью автоматического синтезатора. Эти олигонуклеотиды также можно модифицировать различными способами без ущерба для их способности гибридизоваться с мРНК. Такие модификации могут включать по меньшей мере одну межнуклеотидную связь олигонуклеотида, представляющую собой алкилфосфонат, тиофосфат, фосфородитиоат, метилфосфонат, фосфатный эфир, алкилфосфонотиоат, фосфорамидат, карбамат, карбонат, фосфатгидроксил, ацетамидат или карбоксиметилловый эфир, или комбинацию этих и других межнуклеотидных связей между 5'-концом одного нуклеотида и 3'-концом другого нуклеотида, в котором 5'-нуклеотидная фосфодиэфирная связь заменена любым количеством химических групп.

IV. Модифицированные РНК сайленсинговые агенты против sFlt1

[0244] В некоторых аспектах изобретения агент, подавляющий РНК (или любая его часть) по изобретению, как описано выше, может быть модифицирован таким образом, что активность агента дополнительно улучшается. Например, агенты, подавляющие РНК, описанные в данном документе, могут быть модифицированы любой из модификаций, описанных далее. Модификации могут частично служить для дальнейшего улучшения распознавания мишеней, для повышения стабильности агента (например, для предотвращения деградации), для стимулирования клеточного поглощения, для повышения эффективности мишени, для улучшения эффективности связывания (например, с мишенями), для улучшения толерантности пациента к агенту и/или снижения токсичности.

[0245] В некоторых вариантах осуществления предложены соединения миРНК, обладающие одним или любой комбинацией следующих свойств: (1) полностью химически стабилизированы (т.е. не содержат немодифицированных остатков 2'-ОН); (2) асимметрия; (3) дуплексы из 11-16 пар оснований; (4) чередование химически модифицированных нуклеотидов (например, 2'-фтор- и 2'-метокси-модификаций) или обогащенный 2'-метокси (более 50% 2'-метокси в антисмысловой цепи и более 65% 2'-метокси в смысловой цепи); и (5) одноцепочечные, полностью фосфоротиоированные хвосты из 5-8 оснований. Количество фосфоротиоатных модификаций варьируется от 6 до 17 в разных вариантах осуществления.

[0246] Некоторые соединения по настоящему изобретению, обладающие структурными свойствами, описанными выше и в данном документе, могут называться «гмиРНК-ASP» (гидрофобно-модифицированная малая интерферирующая РНК, характеризующаяся усовершенствованной схемой стабилизации). Кроме того, эта модель гмиРНК-ASP продемонстрировала значительно улучшенное распределение в головном и спинном мозге, доставку в печень, плаценту, почки, селезенку и некоторые другие ткани, что делает их доступными для терапевтического вмешательства.

[0247] В печени гмиРНК-ASP доставляется специфично к эндотелиальным и купперовским клеткам, но не к гепатоцитам, что делает эту схему химической

модификации скорее комплементарной, чем конкурирующей технологией с конъюгатами GalNac.

[0248] Соединения по изобретению могут быть описаны в следующих аспектах и вариантах осуществления.

[0249] В первом аспекте в данном документе предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' CTCTCGGATCTCCAAATTТА 3' (SEQ ID NO:1) или 5' CATCATAGCTACCATTTATT 3' (SEQ ID NO:2); (2) антисмысловая цепь имеет длину по меньшей мере 20 нуклеотидов; (3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 50% 2'-О-метильных модификаций; (4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16 и 20 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; (5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи; (7) смысловая цепь имеет длину по меньшей мере 15 нуклеотидов; (8) смысловая цепь содержит по меньшей мере 65% 2'-О-метильных модификаций; (9) нуклеотиды в любом или нескольких из положений 4, 6, 8, 10 и 14 от 5'-конца смысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; и (10) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

[0250] В варианте осуществления первого аспекта изобретения нуклеотиды в положениях 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16 и 20 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метокси-рибонуклеотидами и нуклеотиды в положениях 4, 6, 8, 10 и 14 от 5'-конца смысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами.

[0251] В варианте осуществления первого аспекта изобретения длина антисмысловой цепи составляет 21 нуклеотид, а длина смысловой цепи составляет 16 нуклеотидов.

[0252] В варианте осуществления первого аспекта изобретения антисмысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' UAAAUUUGGAGAUCCGAGAGA 3', а смысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' CGGAUCUCCAAAUUUA 3'.

[0253] В варианте осуществления первого аспекта изобретения антисмысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' UAUAAAUGGUAGCUAUGAUGA 3', а смысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' AUAGCUACCAUUUAUA 3'.

[0254] В варианте осуществления первого аспекта изобретения антисмысловая цепь содержит 5' винилфосфонат.

[0255] Во втором аспекте в данном документе предложена двухцепочечная РНК

(дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' CTCTCGGATCTCCAAATTТА 3' (SEQ ID NO:1) или 5' CATCATAGCTACCATTTATT 3' (SEQ ID NO:2); (2) антисмысловая цепь содержит чередующиеся 2'-метоксирибонуклеотиды и 2'-фторрибонуклеотиды; (3) нуклеотиды в положениях 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; (4) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-7 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; и (5) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи; (6) смысловая цепь содержит чередующиеся 2'-метоксирибонуклеотиды и 2'-фторрибонуклеотиды; и (7) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

[0256] В варианте осуществления второго аспекта изобретения длина антисмысловой цепи составляет 21 нуклеотид, а длина смысловой цепи составляет 16 нуклеотидов.

[0257] В варианте осуществления второго аспекта изобретения антисмысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' UAAAUUGGAGAUCCGAGAGA 3', а смысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' CGGAUCUCCAAAUUUA 3'.

[0258] В варианте осуществления второго аспекта изобретения антисмысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' UAUAAAUGGUAGCUAUGAUGA 3', а смысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' AUAGCUACCAUUUAUA 3'.

[0259] В варианте осуществления второго аспекта изобретения антисмысловая цепь содержит 5' винилфосфонат.

[0260] В третьем аспекте в данном документе предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' CTCTCGGATCTCCAAATTТА 3' (SEQ ID NO:1) или 5' CATCATAGCTACCATTTATT 3' (SEQ ID NO:2); (2) антисмысловая цепь имеет длину по меньшей мере 20 нуклеотидов; (3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 50% 2'-О-метильных модификаций; (4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16 и 18 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; (5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи; (7) смысловая цепь имеет длину по меньшей мере 15 нуклеотидов; (8) смысловая цепь содержит по меньшей мере 80% 2'-О-метильных модификаций; (9)

нуклеотиды в любом или нескольких из положений 7, 9 и 11 от 5'-конца смысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; и (10) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

[0261] В варианте осуществления третьего аспекта изобретения нуклеотиды в положениях 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16 и 18 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метокси-рибонуклеотидами и нуклеотиды в положениях 7, 9 и 11 от 5'-конца смысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами.

[0262] В варианте осуществления третьего аспекта изобретения длина антисмысловой цепи составляет 21 нуклеотид, а длина смысловой цепи составляет 16 нуклеотидов.

[0263] В варианте осуществления третьего аспекта изобретения антисмысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' UAAAUUUGGAGAUCGAGAGA 3', а смысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' CGGAUCUCCAAAUUA 3'.

[0264] В варианте осуществления третьего аспекта изобретения антисмысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' UAUAAAUGGUAGCUAUGAUGA 3', а смысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' AUAGCUACCAUUUAUA 3'.

[0265] В варианте осуществления третьего аспекта изобретения антисмысловая цепь содержит 5' винилфосфонат.

[0266] В четвертом аспекте в данном документе предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' CTCTCGGATCTCCAAATTTA 3' (SEQ ID NO:1) или 5' CATCATAGCTACCATTATT 3' (SEQ ID NO:2); (2) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов; (3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 70% 2'-О-метильных модификаций; (4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2, 4, 5, 6, 8 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; (5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи; (7) длина смысловой цепи составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов; (8) смысловая цепь содержит 100% 2'-О-метильных модификаций; и (9) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

[0267] В варианте осуществления четвертого аспекта нуклеотиды в положениях 2, 4, 5, 6, 8 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами.

[0268] В варианте осуществления четвертого аспекта изобретения длина

антисмысловой цепи составляет 21 нуклеотид, а длина смысловой цепи составляет 16 нуклеотидов.

[0269] В варианте осуществления четвертого аспекта изобретения антисмысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' UAAAUUUGGAGAUCCGAGAGA 3', а смысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' CGGAUCUCCAAAUUUA 3'.

[0270] В варианте осуществления четвертого аспекта изобретения антисмысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' UAUAAAUGGUAGCUAUGAUGA 3', а смысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' AUAGCUACCAUUUAUA 3'.

[0271] В варианте осуществления четвертого аспекта изобретения антисмысловая цепь содержит 5' винилфосфонат.

[0272] В пятом аспекте в данном документе предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' CTCTCGGATCTCCAAATTТА 3' (SEQ ID NO:1) или 5' CATCATAGCTACCATTTATT 3' (SEQ ID NO:2); (2) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов; (3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 75% 2'-О-метильных модификаций; (4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2, 4, 5, 6 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; (5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи; (7) длина смысловой цепи составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов; (8) смысловая цепь содержит 100% 2'-О-метильных модификаций; и (9) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

[0273] В варианте осуществления пятого аспекта изобретения нуклеотиды в положениях 2, 4, 5, 6 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами.

[0274] В варианте осуществления пятого аспекта изобретения длина антисмысловой цепи составляет 21 нуклеотид, а длина смысловой цепи составляет 16 нуклеотидов.

[0275] В варианте осуществления пятого аспекта изобретения антисмысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' UAAAUUUGGAGAUCCGAGAGA 3', а смысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' CGGAUCUCCAAAUUUA 3'.

[0276] В варианте осуществления пятого аспекта изобретения антисмысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' UAUAAAUGGUAGCUAUGAUGA

3', а смысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' AUAGCUACCAUUUAUA 3'.

[0277] В варианте осуществления пятого аспекта изобретения антисмысловая цепь содержит 5' винилфосфонат.

[0278] В шестом аспекте в данном документе предложена молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, причем каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом: (1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' CTCTCGGATCTCCAAATTТА 3' (SEQ ID NO:1) или 5' CATCATAGCTACCATTТТАТТ 3' (SEQ ID NO:2); (2) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов; (3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 85% 2'-О-метильных модификаций; (4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; (5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи; (7) длина смысловой цепи составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов; (8) смысловая цепь содержит 100% 2'-О-метильных модификаций; и (9) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

[0279] В варианте осуществления шестого аспекта изобретения нуклеотиды в положениях 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами.

[0280] В варианте осуществления шестого аспекта изобретения длина антисмысловой цепи составляет 21 нуклеотид, а длина смысловой цепи составляет 16 нуклеотидов.

[0281] В варианте осуществления шестого аспекта изобретения антисмысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' UAAAUUUGGAGAUCGAGAGA 3', а смысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' CGGAUCUCCAAAUUUA 3'.

[0282] В варианте осуществления шестого аспекта изобретения антисмысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' UAUAUAUGGUAGCUAUGAUGA 3', а смысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' AUAGCUACCAUUUAUA 3'.

[0283] В варианте осуществления шестого аспекта изобретения антисмысловая цепь содержит 5' винилфосфонат.

[0284] В варианте осуществления любого из аспектов настоящего изобретения с первого по шестой 3'-конец смысловой цепи связан с PC-DCA (фосфохолин-докозаноевой кислотой) через аминоклинкер C7 и расщепляемый линкер dTdT.

1) Модификации для усиления распознавания мишени

[0285] В некоторых вариантах осуществления агенты, подавляющие РНК, по настоящему изобретению могут быть заменены дестабилизирующим нуклеотидом для усиления распознавания мишени в виде одного нуклеотида (см. заявку США №№ 11/698,689, поданную 25 января 2007 г., и предварительную заявку США № 60/762,225, поданную 25 января 2006 г., обе из которых включены в настоящий документ посредством ссылки). Такая модификация может быть достаточной для устранения специфичности агента, подавляющего РНК, в отношении нецелевой мРНК (например, мРНК дикого типа), без существенного влияния на специфичность агента, подавляющего РНК, в отношении целевой мРНК (например, мутация с приобретением функции мРНК).

[0286] В предпочтительных вариантах осуществления агенты, подавляющие РНК, по настоящему изобретению модифицируются путем введения по меньшей мере одного универсального нуклеотида в их антисмысловую цепь. Универсальные нуклеотиды содержат участки оснований, которые способны без разбора спариваться с любым из четырех обычных нуклеотидных оснований (например, А, G, C, U). Универсальный нуклеотид является предпочтительным, поскольку он оказывает относительно незначительное влияние на стабильность дуплекса РНК или дуплекса, образованного направляющей цепью агента, подавляющего РНК, и целевой мРНК. Иллюстрационные универсальные нуклеотиды включают нуклеотиды, имеющие часть основания инозина или часть основания аналога инозина, выбранную из группы, состоящей из дезоксиинозина (например, 2'-дезоксиинозина), 7-деаза-2'-дезоксиинозина, 2'-аза-2'-дезоксиинозина, РNA-инозина, морфолино-инозина, LNA-инозина, фосфорамидат-инозина, 2'-О-метоксиэтилинозина и 2'-ОМе-инозина. В особенно предпочтительных вариантах осуществления универсальный нуклеотид представляет собой остаток инозина или его природный аналог.

[0287] В некоторых вариантах осуществления агенты, подавляющие РНК, по настоящему изобретению модифицируют путем введения по меньшей мере одного дестабилизирующего нуклеотида в пределах 5 нуклеотидов от нуклеотида, определяющего специфичность (т.е. нуклеотида, который распознает полиморфизм, связанный с заболеванием). Например, дестабилизирующий нуклеотид можно вводить в положение, находящееся в пределах 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида(ов) от нуклеотида, определяющего специфичность. В иллюстративных вариантах осуществления дестабилизирующий нуклеотид вводят в положение, которое находится на расстоянии 3 нуклеотидов от нуклеотида, определяющего специфичность (т.е. так, что между дестабилизирующим нуклеотидом и нуклеотидом, определяющим специфичность, находится 2 стабилизирующих нуклеотида). В агентах, подавляющих РНК, имеющих две цепи или части цепи (например, миРНК и кшРНК), дестабилизирующий нуклеотид может быть введен в цепь или часть цепи, которая не содержит нуклеотид, определяющий специфичность. В предпочтительных вариантах осуществления дестабилизирующий нуклеотид вводят в ту же цепь или часть цепи, которая содержит определяющий специфичность нуклеотид.

2) Модификации для повышения эффективности и специфичности

[0288] В некоторых вариантах осуществления агенты, подавляющие РНК, по настоящему изобретению могут быть изменены для обеспечения повышенной эффективности и специфичности в опосредовании РНКи в соответствии с правилами асимметричного дизайна (см. патенты США №№ 8,309,704, 7,750,144, 8,304,530, 8,329,892 и 8,309,705). Такие изменения облегчают вход антисмысловой цепи миРНК (например, миРНК, сконструированной с использованием способов по изобретению, или миРНК, полученной из кшРНК) в RISC в пользу смысловой цепи, так что антисмысловая цепь преимущественно направляет расщепление или трансляционную репрессию целевой мРНК и, таким образом, увеличивает или улучшает эффективности расщепления и подавления цели. Предпочтительно асимметрия агента, подавляющего РНК, усиливается за счет уменьшения прочности пары оснований между 5'-концом антисмысловой цепи (AS 5') и 3'-концом смысловой цепи (S 3') агента, подавляющего РНК, относительно силы связи или прочности пары оснований между 3'-концом антисмысловой цепи (AS 3') и 5'-концом смысловой цепи (S 5) указанного агента, подавляющего РНК.

[0289] В одном варианте осуществления асимметрия агента, подавляющего РНК по настоящему изобретению может быть усилена таким образом, что между 5'-концом первой или антисмысловой цепи и 3'-концом части смысловой цепи будет меньше пар оснований G:C, чем между 3'-концом первой или антисмысловой цепи и 5'-концом части смысловой цепи. В другом варианте осуществления асимметрия агента, подавляющего РНК по настоящему изобретению может быть усилена таким образом, что между 5'-концом первой или антисмысловой цепи и 3'-концом части смысловой цепи имеется по меньшей мере одна несовпадающая пара оснований. Предпочтительно несовпадающая пара оснований выбирается из группы, состоящей из G:A, C:A, C:U, G:G, A:A, C:C и U:U. В другом варианте осуществления асимметрия агента, подавляющего РНК по настоящему изобретению может быть усилена таким образом, что между 5'-концом первой или антисмысловой цепи и 3'-концом смысловой части цепи имеется по меньшей мере одна несовпадающая пара оснований, например, G:U. В другом варианте осуществления асимметрия агента, подавляющего РНК, по настоящему изобретению может быть усилена таким образом, что имеется по меньшей мере одна пара оснований, содержащая редкий нуклеотид, например, инозин (I). Предпочтительно пару оснований выбирают из группы, состоящей из I:A, I:U и I:C. В еще одном варианте осуществления асимметрия агента, подавляющего РНК, по настоящему изобретению может быть усилена таким образом, что имеется по меньшей мере одна пара оснований, содержащая модифицированный нуклеотид. В предпочтительных вариантах осуществления модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из 2-амино-G, 2-амино-A, 2,6-диамино-G и 2,6-диамино-A.

3) Агенты сайленсинга РНК с повышенной стабильностью.

[0290] Агенты сайленсинга РНК по настоящему изобретению можно модифицировать для улучшения стабильности в сыворотке или в среде роста клеточных культур. Для повышения стабильности 3'-остатки можно стабилизировать против

деградации, например, их можно выбрать таким образом, чтобы они состояли из пуриновых нуклеотидов, особенно аденозиновых или гуанозиновых нуклеотидов. Альтернативно, замена пиримидиновых нуклеотидов модифицированными аналогами, например, замена уридина на 2'-дезокситимидин, допускается и не влияет на эффективность РНК-интерференции.

[0291] В предпочтительном аспекте изобретение относится к агентам, сайленсинга РНК, которые включают первую и вторую цепи, причем вторая цепь и/или первая цепь модифицированы путем замены внутренних нуклеотидов модифицированными нуклеотидами, так что стабильность *in vivo* повышается по сравнению соответствующим немодифицированным агентом сайленсинга РНК. Как определено в данном документе, «внутренний» нуклеотид представляет собой нуклеотид, расположенный в любом положении, кроме 5'-конца или 3'-конца молекулы нуклеиновой кислоты, полинуклеотида или олигонуклеотида. Внутренний нуклеотид может находиться внутри одноцепочечной молекулы или внутри цепи дуплексной или двухцепочечной молекулы. В одном варианте осуществления смысловая цепь и/или антисмысловая цепь модифицируются путем замены по меньшей мере одного внутреннего нуклеотида. В другом варианте осуществления смысловая цепь и/или антисмысловая цепь модифицированы путем замены по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более внутренних нуклеотидов. В другом варианте осуществления смысловая цепь и/или антисмысловая цепь модифицированы путем замены по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более внутренних нуклеотидов. В еще одном варианте осуществления смысловая цепь и/или антисмысловая цепь модифицированы путем замены всех внутренних нуклеотидов.

[0292] В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 50% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 55% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 60% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 65% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 70% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 75% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 80% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 85% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 90% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 95% внутренних

нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 96% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 97% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 98% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 99% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 100% внутренних нуклеотидов.

[0293] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 50% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 55% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 60% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 65% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 70% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 75% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 80% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 85% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 90% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 95% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 96% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 97% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 98% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 99% внутренних нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь модифицирована путем замены по меньшей мере 100% внутренних нуклеотидов.

[0294] В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения агенты сайленсинга РНК могут содержать по меньшей мере один модифицированный аналог нуклеотида. Один или более аналогов нуклеотида могут быть расположены в положениях, где специфическая для мишени сайленсинговая активность, например, РНКи-опосредующая активность или активность трансляционной репрессии существенно

не затрагивается, например, в области на 5'-конце и/или 3'-конце молекулы миРНК. В частности, концы можно стабилизировать путем включения модифицированных аналогов нуклеотидов.

[0295] Типичные аналоги нуклеотидов включают рибонуклеотиды, модифицированные по сахару и/или остову (т.е. включают модификации фосфатно-сахарного остова). Например, фосфодизфирные связи природной РНК могут быть модифицированы для включения по меньшей мере одного гетероатома азота или серы. В иллюстративных рибонуклеотидах с модифицированным остовом фосфоэфирная группа, соединяющаяся с соседними рибонуклеотидами, заменена модифицированной группой, например, фосфотиоатной группой. В иллюстративных рибонуклеотидах с модифицированным сахаром, 2'-ОН-группа заменена группой, выбранной из Н, ОР, R, галогена, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ или ON, где R представляет собой C₁-C₆ алкил, алкенил или алкинил и галоген представляет собой F, Cl, Br или I.

[0296] В конкретных вариантах осуществления модификации представляют собой 2'-фтор, 2'-амино и/или 2'-тио модификации. Особенно предпочтительные модификации включают 2'-фторцитидин, 2'-фторуридин, 2'-фторадеозин, 2'-фторгуанозин, 2'-аминоцитидин, 2'-аминоуридин, 2'-аминоцитидин, -аденозин, 2'-аминогуанозин, 2,6-диаминопурин, 4-тиоуридин и/или 5-аминоаллилуридин. В конкретном варианте осуществления 2'-фторрибонуклеотиды представляют собой каждый уридин и цитидин. Дополнительные типичные модификации включают 5-бромурин, 5-йодурин, 5-метилцитидин, риботимидин, 2-аминопурин, 2'-аминобутирилпиренуридин, 5-фторцитидин и 5-фторуридин. 2'-дезоксинуклеотиды и 2'-ОМе-нуклеотиды также можно использовать в составе модифицированных РНК-сайленсеров по настоящему изобретению. Дополнительные модифицированные остатки включают дезоксиазотисный остаток, инозин, N3-метилуридин, N6,N6-диметиладенозин, псевдоуридин, пуринрибонуклеозид и рибавирин. В особенно предпочтительном варианте 2'-группа представляет собой метильную группу, так что связывающая часть представляет собой 2'-О-метилолигонуклеотид.

[0297] В иллюстрационном варианте осуществления агент сайленсинга РНК, по настоящему изобретению содержит заблокированные нуклеиновые кислоты (LNA). LNA содержат модифицированные сахаром нуклеотиды, которые устойчивы к нуклеазной активности (высокостабильные) и обладают способностью различать отдельные нуклеотиды для мРНК (Elmen et al., *Nucleic Acids Res.*, (2005), 33(1): 439-447; Braasch et al. (2003) *Biochemistry* 42:7967-7975, Petersen и др. (2003) *Trends Biotechnol* 21:74-81). Эти молекулы содержат нуклеиновые кислоты с 2'-О,4'-С-этиленовым мостиком и возможными модификациями, такими как 2'-дезоксид-2"-фторуридин. Более того, LNA повышают специфичность олигонуклеотидов за счет удержания сахарного фрагмента в 3'-эндо-конформации, тем самым предварительно организуя нуклеотид для спаривания оснований и повышая температуру плавления олигонуклеотида на целых 10°C на одно основание.

[0298] В другом иллюстрационном варианте осуществления агент сайленсинга РНК, по настоящему изобретению содержит пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК). ПНК содержат модифицированные нуклеотиды, в которых сахарофосфатная часть нуклеотида заменена нейтральным 2-аминоэтилглициновым фрагментом, способным образовывать полиамидный остов, который обладает высокой устойчивостью к расщеплению нуклеазой и придает молекуле улучшенную специфичность связывания (Nielsen, et al., Science, (2001), 254: 1497-1500).

[0299] Также предпочтительными являются рибонуклеотиды, модифицированные нуклеиновыми основаниями, т.е. рибонуклеотиды, содержащие по меньшей мере одно нуклеиновое основание неприродного происхождения вместо встречающегося в природе нуклеинового основания. Основания могут быть модифицированы для блокирования активности аденозиндезаминазы. Типичные модифицированные нуклеиновые основания включают, но не ограничиваются ими, уридин и/или цитидин, модифицированные в положении 5, например, 5-(2-амино)пропилируридин, 5-бромуридин; аденозин и/или гуанозин, модифицированные в положении 8, например, 8-бромгуанозин; дезануклеотиды, например, 7-деза-аденозин; Подходящими являются О- и N-алкилированные нуклеотиды, например, N6-метиладенозин. Следует отметить, что приведенные выше модификации могут комбинироваться.

[0300] В других вариантах осуществления сшивание можно использовать для изменения фармакокинетики агента сайленсинга РНК, например, для увеличения периода полувыведения в организме. Таким образом, изобретение включает агенты сайленсинга РНК, имеющие две комплементарные цепи нуклеиновой кислоты, где две цепи сшиты. Изобретение также включает агенты сайленсинга РНК, которые конъюгированы или неконъюгированы (например, на своем 3'-конце) с другим фрагментом (например, фрагментом, не содержащим нуклеиновой кислоты, таким как пептид), органическим соединением (например, красителем) или т.п. Модификация производных миРНК таким способом может улучшить клеточное поглощение или усилить клеточную направленную активность полученного производного миРНК по сравнению с соответствующей миРНК, полезна для отслеживания производного миРНК в клетке или улучшить стабильность производного миРНК по сравнению с соответствующим производным миРНК.

[0301] Другие примеры модификаций включают: (a) 2'-модификацию, например, обеспечение фрагмента 2'-ОМе на U в смысловой или антисмысловой цепи, но особенно в смысловой цепи, и/или фрагмента 2' F на U в смысловой или антисмысловой цепи, но особенно в смысловой цепи, и/или фрагмента 2'ОМе на 3'-выступе, например, на 3'-концевом остатке (3'-концевой остаток означает на 3'-атоме молекулы или на самом 3'-фрагменте, например, в самом 3' Р или 2' положении, как указано в контексте) и/или 2' F-группа; (b) модификацию основной цепи, например, с заменой O на S в фосфатном остове, например, введение фосфоротиоатной модификации на U или A или обе, особенно на антисмысловой цепи; например, с заменой P на S; (c) замену U аминоклином C5; (d) замену A на G (предпочтительно, чтобы изменения последовательности располагались на

смысловой цепи, а не на антисмысловой цепи); и (d) модификацию в положении 2', 6', 7' или 8'. Иллюстративными вариантами осуществления являются те, в которых одна или более из этих модификаций присутствуют в смысловой цепи, но не в антисмысловой цепи, или варианты осуществления, в которых антисмысловая цепь имеет меньше таких модификаций. Другие типичные модификации включают использование метилированного Р в 3'-выступе, например, на 3'-концевом остатке; сочетание 2'-модификации, например, предоставления фрагмента 2'-О Me и модификации основной цепи, например, с заменой Р на S, например, обеспечение фосфоротиоатной модификации, или использование метилированного Р на 3'-выступе, например, на 3'-концевом остатке; модификацию 3'-алкилом; модификацию абазовым пирролидоном на 3'-выступе, например, на 3'-концевом остатке; модификацию напроксеном, ибупрофеном или другими фрагментами, которые ингибируют деградацию на 3'-концевом остатке.

Глубокомодифицированные агенты сайленсинга РНК

[0302] В некоторых вариантах осуществления агент сайленсинга РНК содержит по меньшей мере 80% химически модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления агент сайленсинга РНК полностью химически модифицирован, т.е. 100% нуклеотидов модифицированы химически.

[0303] В некоторых вариантах осуществления агент сайленсинга РНК представляет собой богатый 2'-О-метил, т.е. содержит более 50% 2'-О-метила. В некоторых вариантах осуществления агент сайленсинга РНК содержит по меньшей мере около 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления агент сайленсинга РНК содержит по меньшей мере около 70% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления агент сайленсинга РНК содержит от около 70% до около 90% модификаций 2'-О-метилнуклеотида.

[0304] В некоторых вариантах осуществления агент сайленсинга РНК представляет собой дцРНК, содержащую антисмысловую цепь и смысловую цепь. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере около 50% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит более, чем около 50% модификаций 2'-О-метилнуклеотида (например, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90% модификаций 2'-О-метилнуклеотида). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит более 50% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит более 60% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит около 50% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит около 55% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит около 60%

модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит около 60% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит около 65% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит около 70% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит около 75% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит около 80% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит около 85% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит около 90% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит около 99% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит около 100% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит между около 70% и около 90% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит от 100% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит от около 70% до около 90% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит от около 60% до около 100% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит от около 60% до около 95% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит от около 60% до около 90% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит от около 60% до около 85% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит от около 60% до около 80% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит от около 60% до около 75% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит от около 60% до около 70% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит от около 65% до около 90% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит от около 65% до около 85% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит от около 65% до около 80% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит от около 65% до около 75% модификаций 2'-О-метилнуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит от около 65% до около 70% модификаций 2'-О-метилнуклеотида.

[0306] Агенты сайленсинга РНК, богатые 2'-О-метилом, и конкретные схемы химической модификации дополнительно описаны в патенте США № 11,279,930В2 и US2021/0115442А1, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Модификации межнуклеотидных связей

[0307] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна

межнуклеотидная связь, межсубъединичная связь или нуклеотидный остов модифицированы в агенте сайленсинга РНК. В некоторых вариантах осуществления все межнуклеотидные связи в агенте сайленсинга РНК модифицированы. В некоторых вариантах осуществления модифицированная межнуклеотидная связь содержит фосфоротиоатную межнуклеотидную связь. В некоторых вариантах осуществления агент сайленсинга РНК содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления агент сайленсинга РНК содержит 4-16 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления агент сайленсинга РНК содержит 8-13 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления агент сайленсинга РНК представляет собой дцРНК, содержащую антисмысловую цепь и смысловую цепь, каждая из которых содержит 5'-конец и 3'-конец. В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в положениях 1 и 2 на 5'-конце смысловой цепи соединены с соседними рибонуклеотидами посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в положениях 1 и 2 от 3'-конца смысловой цепи соединены с соседними рибонуклеотидами посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в положениях 1 и 2 от 5'-конца антисмысловой цепи соединены с соседними рибонуклеотидами посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены с соседними рибонуклеотидами посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в положениях 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 или 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены с соседними рибонуклеотидами через фосфоротиоатные межнуклеотидные связи. В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-7 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены с соседними рибонуклеотидами посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

4) Модификации для усиления клеточного поглощения

[0308] В других вариантах осуществления агенты сайленсинга РНК можно модифицировать химическими фрагментами, например, для усиления клеточного поглощения клетками-мишенями (например, нейрональными клетками). Таким образом, изобретение включает агенты сайленсинга РНК, которые конъюгированы или неконъюгированы (например, на своем 3'-конце) с другим фрагментом (например, фрагментом, не содержащим нуклеиновой кислоты, таким как пептид), органическим соединением (например, красителем) или т.п. Конъюгацию можно осуществить способами, известными в данной области, например, с использованием способов Lambert et al., *Drug Deliv. Rev.*: 47(1), 99-112 (2001) (описаны нуклеиновые кислоты, загруженные в наночастицы полиалкилцианоакрилата (РАСА)); Fattal et al., *J. Control Release* 53(1-3):137-43 (1998) (описаны нуклеиновые кислоты, связанные с наночастицами); Schwab et al., *Ann. Oncol.* 5 Suppl. 4:55-8 (1994) (описаны нуклеиновые кислоты, связанные с

интеркалирующими агентами, гидрофобными группами, поликатионами или наночастицами РАСА); и Godard et al., Eur. J. Biochem. 232(2):404-10 (1995) (описаны нуклеиновые кислоты, связанные с наночастицами).

[0309] В конкретном варианте осуществления агент сайленсинга РНК конъюгирован с липофильным фрагментом. В одном варианте осуществления липофильный фрагмент представляет собой лиганд, который включает катионную группу. В другом варианте осуществления липофильный фрагмент присоединен к одной или обоим цепям миРНК. В иллюстративном варианте осуществления липофильный фрагмент присоединен к одному концу смысловой цепи миРНК. В другом иллюстративном варианте осуществления липофильный фрагмент присоединен к 3'-концу смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент выбран из группы, состоящей из холестерина, витамина Е, витамина К, витамина А, фолиевой кислоты или катионного красителя (например, Су3). В иллюстративном варианте осуществления липофильный фрагмент представляет собой холестерин. Другие липофильные фрагменты включают холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадециловую группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, О3-(олеоил)литохолевую кислоту, О3-(олеоил)холевую кислоту, диметокситритил или феноксазин.

5) Связывающие лиганды

[0310] Другие объекты могут быть связаны с агентом сайленсинга РНК по настоящему изобретению. Например, лиганд, связанный с агентом сайленсинга РНК для улучшения стабильности, термодинамики гибридизации с целевой нуклеиновой кислотой, нацеливания на конкретную ткань или тип клеток или клеточной проницаемости, например, по эндоцитоз-зависимому или независимому от эндоцитоза механизму. Лиганды и связанные с ними модификации также могут повышать специфичность последовательности и, следовательно, уменьшать нацеливание за пределы участка. Связывающий лиганд может включать одно или более модифицированных оснований или сахаров, которые могут действовать как интеркаляторы. Предпочтительно они расположены во внутренней области, например, в выпуклости дуплекса агента сайленсинга РНК/мишени. Интеркалятор может представлять собой ароматическое соединение, например, полициклическое ароматическое или гетероциклическое ароматическое соединение. Полициклический интеркалятор может обладать способностью к стекированию и может включать системы с 2, 3 или 4 сочлененными кольцами. Описанные в данном документе универсальные основания могут быть включены в лиганд. В одном варианте осуществления лиганд может включать расщепляющую группу, которая способствует ингибированию гена-мишени путем расщепления нуклеиновой кислоты-мишени. Расщепляющая группа может представлять собой, например, блеомицин (например, блеомицин-А5, блеомицин-А2 или блеомицин-В2), пирен, фенантролин (например, О-фенантролин), полиамин, трипептид (например,

lys-tyr-lys трипептид), или группу, хелатирующую ионы металлов. Группа, хелатирующая ион металла, может включать, например, например, макроциклический комплекс Lu(III) или EU(III), производное 2,9-диметилфенантролина Zn(II), терпиридин Cu(II) или акридин, которые могут способствовать селективному расщеплению целевой РНК в месте выпуклости свободными ионами металлов, такими как Lu(III). В некоторых вариантах осуществления пептидный лиганд может быть связан с агентом сайленсинга РНК для стимулирования расщепления целевой РНК, например, в области выпуклости. Например, 1,8-диметил-1,3,6,8,10,13-гексаазациклотетрадекан (циклам) можно конъюгировать с пептидом (например, с помощью производного аминокислоты) для ускорения расщепления целевой РНК. Связывающий лиганд может быть аминогликозидным лигандом, который может придать агенту сайленсинга РНК улучшенные гибридизационные свойства или улучшенную специфичность последовательности. Типичные аминогликозиды включают гликозилированный полилизин, галактозилированный полилизин, неомицин В, тобрамицин, канамицин А и акридиновые конъюгаты аминогликозидов, такие как Neo-N-акридин, Neo-S-акридин, Neo-C-акридин, Tobra-N-акридин и KanaA-N-акридин. Использование аналога акридина может повысить специфичность последовательности. Например, неомицин В обладает высоким сродством к РНК по сравнению с ДНК, но низкой специфичностью к последовательности. Аналог акридина, нео-5-акридин, обладает повышенным сродством к элементу Rev-ответа (RRE) ВИЧ. В некоторых вариантах осуществления аналог гуанидина (гуанидиногликозид) аминогликозидного лиганда связан с агентом сайленсинга РНК. В гуанидиногликозиде аминогруппа аминокислоты заменена на гуанидиновую группу. Присоединение аналога гуанидина может повысить проницаемость клеток агента сайленсинга РНК. Связывающий лиганд может представлять собой полиаргининовый пептид, пептоид или пептидомиметик, который может усиливать клеточное поглощение олигонуклеотидного агента.

[0311] Типичные лиганды связаны, предпочтительно ковалентно, либо прямо, либо опосредованно через промежуточную связь, с носителем, конъюгированным с лигандом. В иллюстративных вариантах осуществления лиганд прикрепляется к носителю посредством промежуточной связи. В иллюстративных вариантах осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или время жизни агента сайленсинга РНК, в который он включен. В иллюстративных вариантах осуществления лиганд обеспечивает повышенное сродство к выбранной мишени, например, молекуле, клетке или типу клеток, компартменту, например, компартменту клетки или органа, ткани, органу или области тела, по сравнению, например, с видом, в котором такой лиганд отсутствует.

[0312] Типичные лиганды могут улучшать транспортные, гибридизационные и специфичные свойства, а также могут улучшать устойчивость к нуклеазам полученного природного или модифицированного агента сайленсинга РНК или полимерной молекулы, содержащей любую комбинацию описанных в данном документе мономеров и/или природных или модифицированных рибонуклеотидов. Лиганды в целом могут включать

терапевтические модификаторы, например, для усиления поглощения; диагностические соединения или группы репортеров, например, для мониторинга распределения; сшивающие агенты; фрагменты, придающие нуклеазорезистентность; и природные или необычные нуклеиновые основания. Общие примеры включают липофилы, липиды, стероиды (например, уваол, гецигенин, диосгенин), терпены (например, тритерпены, например, сарсасапогенин, фриделин, литохоловую кислоту-производное эпифриделанола), витамины (например, фолиевая кислота, витамин А, биотин, пиридоксаль), углеводы, белки, агенты, связывающие белки, молекулы, нацеленные на интегрин, поликатионы, пептиды, полиамины и пептидные имитаторы. Лиганды могут включать встречающиеся в природе вещества (например, человеческий сывороточный альбумин (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL) или глобулин); углеводы (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновую кислоту); аминокислоту или липид. Лиганд также может представлять собой рекомбинантную или синтетическую молекулу, такую как синтетический полимер, например, синтетическую полиаминокислоту. Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, представляющую собой полилизин (PLL), поли L-аспарагиновую кислоту, поли L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер поли(L-лактида и гликолида), сополимер дивинилового эфира-малеинового ангидрида, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламида (НМРА), полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливиниловый спирт (ПВА), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), полимеры N-изопропилакриламида или полифосфазин. Примеры полиаминов включают: полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметический полиамин, дендримерный полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или альфа-спиральный пептид.

[0313] Лиганды могут также включать нацеливающие группы, например, агент, нацеливающий на клетку или ткань, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как плацентарная клетка, клетка почки и/или клетка печени. Нацеливающая группа может представлять собой тиротропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, углевод муцин, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин В12, биотин, или пептид RGD или миметик пептида RGD. Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие агенты (например, акридины и замещенные акридины), сшивающие агенты (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин, фенантролин, пирены), трипептид lys-tyr-lys, аминогликозиды, гуанидиевые аминогликозиды, искусственные эндонуклеазы

(например, ЭДТА), липофильные молекулы, например, холестерин (и его тиоаналоги), холевую кислоту, холановую кислоту, литохолевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пирен масляную кислоту, дигидротестостерон, глицерин (например, сложные эфиры (например, моно-, бис- или трис-эфиры жирных кислот, например, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, или C₂₀ жирные кислоты) и их эфиры, например, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, или C₂₀ алкил, например, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, 1,3-бис-О(октадецил)глицерин), геранилоксигексильная группа, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильная группа, пальмитиновая кислота, стеариновая кислота (например, , глицерилдистеарат), олеиновая кислота, миристиновая кислота, ОЗ-(олеоил)лиохолевая кислота, ОЗ-(олеоил)холеновая кислота, диметокситритил или феноксазин) и пептидные конъюгаты (например, пептид антеннопедии, пептид Tat), алкилирующие агенты, фосфат, аминокислота, меркапто, ПЭГ (например, ПЭГ-40К), MPEG, [MPEG]₂, полиамино, алкил, замещенный алкил, радиоактивно меченные маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), средства, способствующие транспорту/абсорбции (например, аспирин, напроксен, витамин Е, фолиевая кислота), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, кластеры имидазола, конъюгаты акридин-имидазола, комплексы Eu³⁺ тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

[0314] Лиганды могут представлять собой белки, например, гликопротеины, или пептиды, например, молекулы, обладающие специфическим средством к ко-лиганду, или антитела, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как раковая клетка, эндотелиальная клетка или клетка кости. Лиганды могут также включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать непептидные соединения, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза или поливалентная фукоза. Лиганд может представлять собой, например, липополисахарид, активатор киназы p38 MAP или активатор NF-κB.

[0315] Лиганд может представлять собой вещество, например лекарственное средство, которое может увеличивать поглощение агента сайленсинга РНК в клетку, например, путем разрушения цитоскелета клетки, например, путем разрушения клеточных микротрубочек, микрофиламентов и/или промежуточных филаментов. Лекарственное средство может представлять собой, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин. Лиганд может увеличивать поглощение агента сайленсинга РНК в клетке, например, за счет активации воспалительной реакции. Типичные лиганды, которые могут оказывать такое действие, включают фактор некроза опухоли альфа (TNFα), интерлейкин-1 бета или гамма-интерферон. В одном аспекте лиганд представляет собой липид или молекулу на основе липида. Такой липид или молекула на основе липида предпочтительно связывает сывороточный белок, например, человеческий сывороточный альбумин (HSA). Лиганд, связывающий HSA, обеспечивает распределение конъюгата в

ткани-мишени. Например, ткань-мишень может представлять собой плаценту, почки или печень. В качестве лигандов можно использовать и другие молекулы, способные связывать HSA. Например, можно использовать непростин или аспирин. Липид или лиганд на основе липида может (а) повышать устойчивость конъюгата к деградации, (б) усиливать нацеливание или транспорт в клетку-мишень или клеточную мембрану и/или (с) может использоваться для регулирования связывания с сывороточным белком, например, HSA. Лиганд на основе липида можно использовать для модуляции, например, контроля связывания конъюгата с тканью-мишенью. Например, липид или лиганд на основе липида, который сильнее связывается с HSA, с меньшей вероятностью будет направлен на плаценту, печень и/или почки и, следовательно, с меньшей вероятностью будет выведен из организма. Липид или лиганд на основе липида, который менее прочно связывается с HSA, можно использовать для нацеливания конъюгата на плаценту, печень и/или почки. Другие фрагменты, которые нацелены на клетки плаценты, печени и/или почек, также могут быть использованы вместо или в дополнение к лиганду на основе липида.

[0316] В другом аспекте лиганд представляет собой фрагмент, например, витамин, который поглощается клеткой-мишенью, например, пролиферирующей клеткой. Они особенно полезны для лечения заболеваний, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например, злокачественного или незлокачественного типа, например, раковых клеток. Типичные витамины включают витамин А, Е и К. Другие типичные витамины включают витамин В, например, фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль или другие витамины или питательные вещества, поглощаемые раковыми клетками. Также включены HSA и липопротеины низкой плотности (LDL).

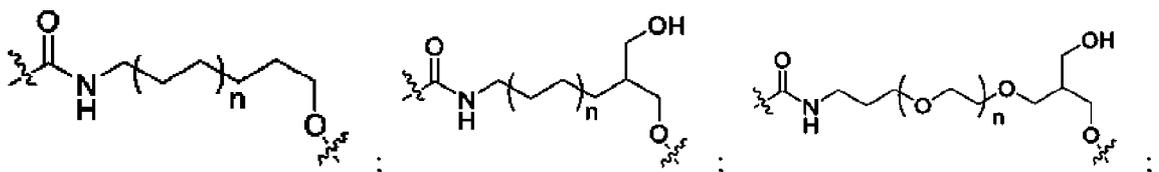
[0317] В другом аспекте лиганд представляет собой агент, проникающий в клетки, предпочтительно агент, проникающий в спиральные клетки. Предпочтительно агент является амфипатическим. Типичный агент представляет собой пептид, такой как tat или antennopodia. Если агент представляет собой пептид, его можно модифицировать, включая пептидилмиметик, инвертомеры, непептидные или псевдопептидные связи и использование D-аминокислот. Спиральный агент предпочтительно представляет собой альфа-спиральный агент, который предпочтительно имеет липофильную и липофобную фазы.

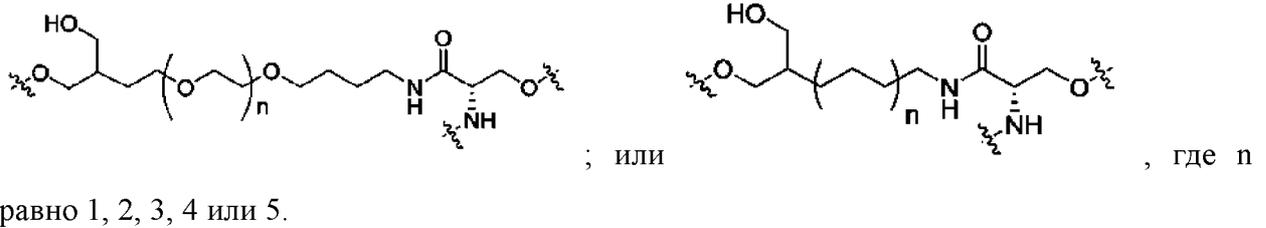
Лиганд может представлять собой пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в данном документе олигопептидомиметик) представляет собой молекулу, способную сворачиваться в определенную трехмерную структуру, подобную природному пептиду. Присоединение пептида и пептидомиметиков к олигонуклеотидным агентам может влиять на фармакокинетическое распределение агента сайлесинга РНК, например, за счет усиления клеточного распознавания и абсорбции. Длина пептида или пептидомиметического фрагмента может составлять около 5-50 аминокислот, например, около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот. Пептид или пептидомиметик

может представлять собой, например, пептид, проникающий в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий в основном из Tyr, Trp или Phe). Пептидный фрагмент может представлять собой дендримерный пептид, пептид с ограниченной конформационной свободой или шитый пептид. Пептидный фрагмент может представлять собой L-пептид или D-пептид. В другом варианте пептидный фрагмент может включать гидрофобную мембранную транслокационную последовательность (MTS). Пептид или пептидомиметик может кодироваться случайной последовательностью ДНК, например, пептидом, идентифицированным из библиотеки фагов или комбинаторной библиотеки "одна бусина - одно соединение" (OBOC) (Lam et al., Nature 354:82-84, 1991). В иллюстрационных вариантах осуществления пептид или пептидомиметик, связанный с агентом сайленсинга РНК, через встроенную мономерную единицу, представляет собой пептид, нацеленный на клетки, такой как пептид аргинин-глицин-аспарагиновой кислоты (RGD) или имитатор RGD. Пептидный фрагмент может иметь длину от около 5 до около 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут иметь структурную модификацию, например, для повышения стабильности или направления конформационных свойств.

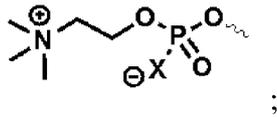
[0318] В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент связан с 5'-концом и/или 3'-концом агента сайленсинга РНК, по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент связан с 5'-концом и/или 3'-концом антисмысловой цепи агента сайленсинга РНК, по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент связан с 5'-концом и/или 3'-концом смысловой цепи агента сайленсинга РНК по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент связан с 3'-концом смысловой цепи агента сайленсинга РНК по настоящему изобретению.

[0319] В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент связан с агентом сайленсинга РНК посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент связан с антисмысловой цепью и/или смысловой цепью с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент связан с 3'-концом смысловой цепи с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер включает двухвалентный или трехвалентный линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер включает цепь этиленгликоля, алкильную цепь, пептид, РНК, ДНК, фосфодиэфир, фосфоротиоат, фосфорамидат, амид, карбамат или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления двухвалентный или трехвалентный линкер выбран из:

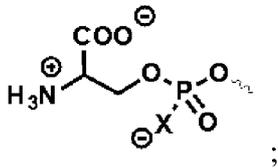




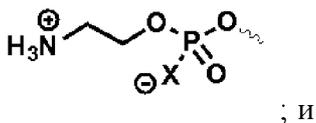
[0320] В некоторых вариантах осуществления линкер дополнительно включает фосфодиэфир или производное фосфодиэфира. В некоторых вариантах осуществления фосфодиэфир или производное фосфодиэфира выбрано из группы, состоящей из:



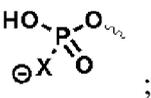
(Zc1);



(Zc2);



(Zc3)



(Zc4)

где X представляет собой O, S или BH_3 .

[0321] Различные функциональные фрагменты по настоящему изобретению и способы их конъюгации с агентами сайленсинга РНК описаны более подробно в WO2017/030973A1 и WO2018/031933A2, включенных в данный документ посредством ссылки.

[0322] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер.

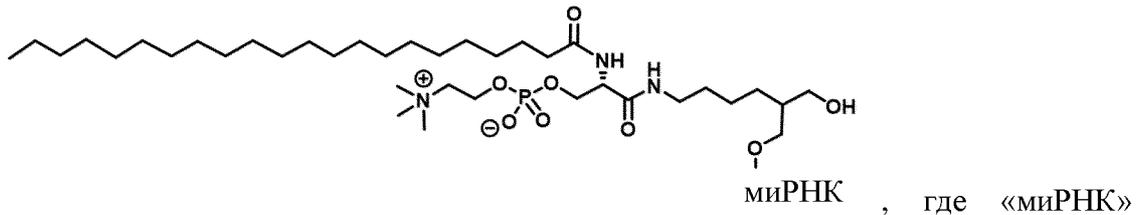
[0323] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит фосфодиэфирную связь, дисульфидную связь, кислотолабильную связь или фоторасщепляемую связь.

[0324] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает динуклеотид dTdT с фосфодиэфирными межнуклеотидными связями.

[0325] В некоторых вариантах осуществления кислотно-лабильная связь включает β -тиопропионатную связь или связь карбоксидиметилмалеинового ангидрида (CDM).

[0326] В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент PC-DCA

с амиолинкером С7 представлен:



соответствует 3'-концу смысловой цепи.

V. Способы введения нуклеиновых кислот, векторов и клеток-хозяев

[0327] Агенты сайленсинга РНК, по настоящему изобретению можно вводить непосредственно в клетку (например, нервную клетку) (т.е. внутриклеточно); или вводить внеклеточно в полость, интерстициальное пространство, в кровоток организма, вводить перорально или можно вводить путем промывки клетки или организма в растворе, содержащем нуклеиновую кислоту. Сосудистая или внесосудистая циркуляция, кровь или лимфатическая система и спинномозговая жидкость представляют собой места, куда может быть введена нуклеиновая кислота.

[0328] Агенты сайленсинга РНК по настоящему изобретению можно вводить с использованием способов доставки нуклеиновой кислоты, известных в данной области техники, включая инъекцию раствора, содержащего нуклеиновую кислоту, бомбардировку частицами, покрытыми нуклеиновой кислотой, вымачивание клетки или организма в растворе нуклеиновой кислоты или электропорацию клеточных мембран в присутствии нуклеиновой кислоты. Для введения нуклеиновых кислот в клетки можно использовать и другие способы, известные в данной области, например, липидно-опосредованный перенос, химически-опосредованный перенос, трансфекция катионными липосомами, такими как фосфат кальция, и тому подобное. Нуклеиновую кислоту можно вводить вместе с другими компонентами, которые выполняют одно или более из следующих действий: усиливают поглощение нуклеиновой кислоты клеткой или иным образом усиливают ингибирование гена-мишени.

[0329] Физические способы введения нуклеиновых кислот включают инъекцию раствора, содержащего РНК, бомбардировку частицами, покрытыми РНК, замачивание клетки или организма в растворе РНК или электропорацию клеточных мембран в присутствии РНК. Вирусная конструкция, упакованная в вирусную частицу, обеспечивает как эффективное введение экспрессионной конструкции в клетку, так и транскрипцию РНК, кодируемой экспрессионной конструкцией. Могут быть использованы другие способы, известные в данной области техники, для введения нуклеиновых кислот в клетки, такие как липид-опосредованный транспорт носителя, химически-опосредованный транспорт, такой как фосфат кальция, и т.п. Таким образом, РНК можно вводить вместе с компонентами, которые выполняют одно или более из следующих действий: усиливают поглощение РНК клеткой, ингибируют отжиг одиночных цепей, стабилизируют одиночные цепи или иным образом усиливают ингибирование гена-мишени.

[0330] РНК можно вводить непосредственно в клетку (т.е. внутриклеточно); или

вводить внеклеточно в полость, интерстициальное пространство, в кровообращение организма, вводить перорально или можно вводить путем промывания клетки или организма в растворе, содержащем РНК. Сосудистая или внесосудистая циркуляция, кровь или лимфатическая система и спинномозговая жидкость представляют собой области, куда можно вводить РНК.

[0331] Клетка, имеющая ген-мишень, может происходить из зародышевой линии или соматической, тотипотентной или плюрипотентной, делящейся или неделящейся, паренхимной или эпителиальной, иммортализованной или трансформированной и т.п. Клетка может представлять собой стволовую клетку или дифференцированную клетку. Дифференцированные типы клеток включают адипоциты, фибробласты, миоциты, кардиомиоциты, эндотелий, нейроны, глию, клетки крови, мегакариоциты, лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, тучные клетки, лейкоциты, гранулоциты, кератиноциты, хондроциты, остеобласты, остеокласты, гепатоциты и клетки эндокринных или экзокринных желез.

[0332] В зависимости от конкретного гена-мишени и дозы доставленного материала двухцепочечной РНК этот процесс может привести к частичной или полной потере функции гена-мишени. Показательным является снижение или потеря экспрессии генов по меньшей мере в 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% или более клетках-мишенях. Ингибирование экспрессии гена означает отсутствие (или наблюдаемое снижение) уровня белка и/или продукта мРНК гена-мишени. Специфичность относится к способности ингибировать ген-мишень без явного воздействия на другие гены клетки. Последствия ингибирования могут быть подтверждены путем изучения внешних свойств клетки или организма (как представлено ниже в примерах) или с помощью биохимических способов, таких как гибридизация в растворе РНК, нуклеазная защита, нозерн-гибридизация, обратная транскрипция, мониторинг экспрессии генов с помощью микрочипа, связывание антител, иммуноферментный анализ (ELISA), вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ (RIA), другие иммуноанализы и сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

[0333] Для РНК-опосредованного ингибирования в клеточной линии или целом организме экспрессию гена удобно анализировать с использованием репортерного гена или гена лекарственной устойчивости, белковый продукт которого легко анализируется. Такие репортерные гены включают ацетогидроксикислотсинтазу (AHAS), щелочную фосфатазу (AP), бета-галактозидазу (LacZ), бета-глюкоронидазу (GUS), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), зеленый флуоресцентный белок (GFP), пероксидазу хрена (HRP), люциферазу (Luc), нопалинсинтазу (NOS), октопинсинтазу (OCS) и их производные. Доступны многочисленные селективируемые маркеры, которые придают устойчивость к ампициллину, блеомицину, хлорамфениколу, гентарницину, гигромицину, канамицину, линкомицину, метотрексату, фосфинотрицину, пуромицину и тетрациклину. В зависимости от анализа количественная оценка уровня экспрессии гена позволяет определить степень ингибирования, превышающую 10%, 33%, 50%, 90%, 95%

или 99% по сравнению с клеткой, не обработанной согласно способа настоящего изобретения. Более низкие дозы инъецируемого материала и более длительное время после введения агента РНКи могут привести к ингибированию меньшей фракции клеток (например, по меньшей мере 10%, 20%, 50%, 75%, 90% или 95% клеток-мишеней). Квантование экспрессии генов в клетке может показать сходную степень ингибирования на уровне накопления целевой мРНК или трансляции целевого белка. Например, эффективность ингибирования можно определить путем оценки количества генного продукта в клетке; мРНК можно обнаружить с помощью гибридизационного зонда, имеющего нуклеотидную последовательность вне области, используемой для ингибирующей двухцепочечной РНК, или транслируемый полипептид можно обнаружить с помощью антитела, выработанного против полипептидной последовательности этой области.

[0334] РНК можно вводить в количестве, позволяющем доставить по меньшей мере одну копию на клетку. Более высокие дозы (например, по меньшей мере 5, 10, 100, 500 или 1000 копий на клетку) материала могут обеспечить более эффективное ингибирование; более низкие дозы также могут быть полезны для конкретных применений.

[0335] В иллюстрационном аспекте эффективность РНКи-агента по настоящему изобретению (например, миРНК, нацеленной на целевую интронную последовательность *flt1*) тестируют на предмет его способности специфически разрушать мутантную мРНК (например, мРНК *sflt1* и/или продукцию белка *sFlt1*) в клетках, в частности, в плацентарных клетках (например, лабиринтных клетках, трофобластах (например, синцитиотрофобластах и/или цитотрофобластах), мезенхимальных клетках, макрофагах мезенхимального происхождения (клетки Хофбауэра), фибробластах, фетальных сосудистых клетках (например, гладкомышечных клетках, периваскулярных клетках (перициты) и эндотелиальных клетках)), клетках печени и/или клетках почек. Для проведения валидационных анализов на основе клеток также подходят другие легко трансфицируемые клетки, например, клетки трофобласта, клетки HeLa или клетки COS. Клетки трансфицируют кДНК человека дикого типа или мутантной кДНК (например, кДНК человека дикого типа или секретируемой *flt1*). Стандартная миРНК, модифицированная миРНК или векторы, способные производить миРНК из U-петли мРНК, подвергаются совместной трансфекции. Измеряют селективное снижение целевой мРНК (например, мРНК *sflt1*) и/или целевого белка (например, белка *sFlt1*). Снижение уровня целевой мРНК или белка можно сравнить с уровнем целевой мРНК или белка в отсутствие агента РНКи или в присутствии агента РНКи, который не нацелен на мРНК *sflt1*. Экзогенно введенные мРНК или белок (или эндогенная мРНК или белок) можно анализировать в целях сравнения. При использовании нейрональных клеток, которые, как известно, в некоторой степени устойчивы к стандартным способам трансфекции, может быть желательно ввести агенты РНКи (например, миРНК) путем пассивного поглощения.

VI. СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

[0336] В настоящем изобретении предложены как профилактические, так и терапевтические способы лечения субъекта, подверженного риску (или предрасположенного к) заболеванию или расстройству, вызванного полностью или частично секретируемым белком Flt1. В одном варианте осуществления заболевание или расстройство представляет собой заболевание или расстройство печени. В другом варианте осуществления заболевание или расстройство представляет собой заболевание или расстройство почек. В одном варианте осуществления заболевание или расстройство представляет собой плацентарное заболевание или расстройство. В одном варианте осуществления заболевание или расстройство представляет собой заболевание или расстройство, связанное с беременностью. В предпочтительном варианте осуществления заболевание или расстройство представляет собой расстройство, связанное с экспрессией растворимого белка Flt1 и при котором усиленная экспрессия растворимого белка Flt1 приводит к клиническим проявлениям ПЭ, послеродовой ПЭ, эклампсии и/или HELLP. В некоторых вариантах реализации заболевание или расстройство представляет собой ПЭ. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой послеродовую ПЭ. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой эклампсию. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой HELLP.

[0337] «Терапия» или «лечение» в настоящем документе определяется как применение или введение терапевтического агента (например, РНК-агента или вектора, или кодирующего его трансгена) пациенту, или применение или введение терапевтического агента в изолированную ткань или клеточную линию пациента, имеющего заболевание или расстройство, симптом заболевания или расстройства или предрасположенность к заболеванию или расстройству, с целью лечения, исцеления, облегчения, ослабления, изменения, исправления, улучшения, или воздействия на заболевание или расстройство, симптомы заболевания или расстройства или предрасположенность к заболеванию.

[0338] В одном аспекте изобретение обеспечивает способ профилактики у субъекта заболевания или расстройства, как описано выше, путем введения субъекту терапевтического агента (например, РНКи-агента или вектора, или кодирующего его трансгена). Субъектов с риском заболевания можно идентифицировать, например, с помощью любого или комбинации диагностических или прогностических анализов, как описано в данном документе. Введение профилактического средства может происходить до проявления симптомов, характерных для заболевания или расстройства, так что заболевание или расстройство можно предотвратить или, альтернативно, задержать его прогрессирование.

[0339] Другой аспект изобретения относится к способам терапевтического лечения субъектов, т.е. изменения проявления симптомов заболевания или расстройства. В иллюстрационном варианте осуществления способ модуляции по настоящему изобретению включает приведение в контакт клетки, экспрессирующей мутант с

усилением функции, с терапевтическим агентом (например, РНКи-агентом или вектором, или кодирующим его трансгеном), который специфичен в отношении одной или более целевых последовательностей внутри гена (например, SEQ ID NO: 1 или 2 или любые их комбинации), так что достигается специфическое вмешательство в ген с учетом последовательности. Эти способы можно осуществлять *in vitro* (например, путем культивирования клеток с агентом) или, альтернативно, *in vivo* (например, путем введения агента субъекту).

[0340] Что касается как профилактических, так и терапевтических способов лечения, такие способы лечения могут быть специально адаптированы или модифицированы на основе знаний, полученных в области фармакогеномики. В контексте данного документа «Фармакогеномика» относится к применению технологий геномики, таких как секвенирование генов, статистическая генетика и анализ экспрессии генов к лекарствам, находящимся в клинической разработке и на рынке. Более конкретно, этот термин относится к изучению того, как гены пациента определяют его или ее реакцию на лекарственное средство (например, «фенотип реакции на лекарственное средство» или «генотип реакции на лекарственное средство»). Таким образом, в другом аспекте изобретения предложены способы подбора профилактического или терапевтического лечения индивидуума с использованием молекул генов-мишеней по настоящему изобретению или модуляторов генов-мишеней в соответствии с генотипом ответа индивидуума на лекарственное средство. Фармакогеномика позволяет клиницисту или врачу нацелить профилактическое или терапевтическое лечение на пациентов, которым лечение принесет наибольшую пользу, и избежать лечения пациентов, у которых будут возникать токсичные побочные эффекты, связанные с приемом лекарств.

[0341] Терапевтические агенты можно тестировать на подходящей модели животных. Например, агент РНКи (или вектор экспрессии, или кодирующий его трансген), как описано в настоящем документе, можно использовать в животной модели для определения эффективности, токсичности или побочных эффектов лечения указанным агентом. Альтернативно, терапевтический агент можно использовать на животной модели для определения механизма действия такого агента. Например, агент можно использовать на животной модели для определения эффективности, токсичности или побочных эффектов лечения таким агентом. Альтернативно, агент можно использовать на животной модели для определения механизма действия такого агента.

[0342] Фармацевтическую композицию, содержащую агент сайленсинга РНК по настоящему изобретению, можно вводить любому пациенту, у которого диагностировано или существует риск развития заболевания, связанного с беременностью, печенью и/или почками, например, ПЭ и/или эклампсии. В одном варианте осуществления у пациента диагностируют ПЭ и/или эклампсию, а в остальном у пациента хорошее здоровье. Например, пациент не является неизлечимо больным и, скорее всего, проживет не менее 2, 3, 5 или более лет после постановки диагноза. Пациента можно лечить сразу после постановки диагноза или лечение можно отложить до тех пор, пока у пациента не

появятся более изнурительные симптомы, такие как два или более симптомов ПЭ или один или несколько симптомов эклампсии. В другом варианте осуществления пациент не достиг поздней стадии заболевания.

[0343] Доставка агента сайленсинга РНК, непосредственно в орган (например, непосредственно в плаценту, печень и/или почки) может осуществляться в дозировке, которая эффективна для лечения или предотвращения заболевания или расстройства, связанного с печенью, почками или беременностью, например, ПЭ, послеродовой ПЭ, эклампсии и/или HELLP.

[0344] Концентрация композиции агента сайленсинга РНК представляет собой количество, достаточное для эффективного лечения или предотвращения расстройства или регулирования физиологического состояния у человека. Концентрация или количество вводимого агента сайленсинга РНК будет зависеть от параметров, определенных для агента, и способа введения, например, назальный, буккальный или легочный.

VI. Фармацевтические композиции и способы введения

[0345] Изобретение относится к использованию вышеописанных агентов для профилактического и/или терапевтического лечения, как описано *ниже*. Соответственно, модуляторы (например, агенты РНКи) по настоящему изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции обычно содержат молекулу нуклеиновой кислоты, белок, антитело или модулирующее соединение и фармацевтически приемлемый носитель. В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и т.п., совместимые с фармацевтическим введением. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какие-либо традиционные среды или агенты несовместимы с активным соединением, их использование в композициях рассматривается под вопросом. В композиции также можно включать дополнительные активные соединения.

[0346] Фармацевтические композиции, содержащие агенты РНКи (например, дцРНК), представленные в настоящем документе, включают любые фармацевтически приемлемые соли, сложные эфиры или соли таких сложных эфиров. Соответственно, например, изобретение также относится к фармацевтически приемлемым солям РНКи-агентов, пролекарствам, фармацевтически приемлемым солям таких пролекарств и другим биоэквивалентам. Подходящие фармацевтически приемлемые соли включают, но не ограничиваются ими, соли натрия и калия. В некоторых вариантах осуществления в изобретении представлены соли агентов РНКи (например, дцРНК). В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены соли агентов дцРНК. В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены соли агентов миРНК. В некоторых вариантах осуществления соль представляет собой натриевую соль. В некоторых

вариантах осуществления соль представляет собой калиевую соль. В некоторых вариантах осуществления соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления соль агента РНК представляет собой фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления соль агента дцРНК представляет собой фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления соль агента миРНК представляет собой фармацевтически приемлемую соль.

[0347] Фармацевтическая композиция по изобретению составлена таким образом, чтобы быть совместимой с предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например, внутривенное (IV), внутрикожное, подкожное (SC или SQ), внутривнутрибрюшинное, внутримышечное, пероральное (например, ингаляционное), трансдермальное (топическое) и трансмукозальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутрикожного или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика.

[0348] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (если они водорастворимы) или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. В случае внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, кремофор ELTM (BASF, Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и текучей в той степени, чтобы ее было легко набрать в шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, которые содержат, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и т. п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом,

аскорбиновой кислотой, тимеросалом и т.п. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию агента, замедляющего всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

[0349] Стерильные инъекционные растворы можно готовить путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, в случае необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. В общем случае дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка, которые позволяют получить порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из предварительно отфильтрованного стерильного раствора.

[0350] Композиции для перорального введения обычно включают инертный разбавитель или съедобный носитель. Они могут быть заключены в желатиновые капсулы или спрессованы в таблетки. В целях перорального терапевтического введения активное соединение можно включать вместе со вспомогательными веществами и использовать в форме таблеток, пастилок или капсул. Пероральные композиции также можно готовить, используя жидкий носитель для применения в виде ополаскивателя для рта, при этом соединение в жидком носителе применяется перорально с полосканием и выплевыванием или глотанием. Фармацевтически совместимые связующие агенты и/или адъювантные материалы также могут быть включены в качестве части композиции. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и т. п. могут содержать любой из следующих ингредиентов или соединений схожей природы: связующее вещество, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; вспомогательное вещество, такое как крахмал или лактоза, разрыхлитель, такой как альгиновая кислота, примогель или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или Sterotes; глидант, такой как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин; или ароматизатор, такой как перечная мята, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор.

[0351] Для введения путем ингаляции соединения доставляются в форме аэрозольного спрея из находящегося под давлением контейнера или дозатора, который содержит подходящий пропеллент, например, газ, такой как диоксид углерода, или из небулайзера.

[0352] Системное введение можно также осуществлять трансмукозальными или трансдермальными способами. В случае трансмукозального или трансдермального введения в составе используются пенетранты, подходящие для проникновения через

барьер. Такие пенетранты в целом известны в данной области техники и включают в себя, например, в случае трансмукозального введения, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидовой кислоты. Трансмукозальное введение может быть осуществлено за счет использования назальных спреев или суппозитория. Для трансдермального введения активные соединения изготавливают в виде мазей, бальзамов, гелей или кремов, как в целом известно в данной области техники.

[0353] Соединения также могут быть приготовлены в форме суппозитория (например, с обычными основами для суппозитория, таких как масло какао и другие глицериды) или клизм с удержанием для ректальной доставки.

[0354] Агенты сайленсинга РНК также могут быть введены путем трансфекции или инфекции с использованием способов, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, способы, описанные в McCaffrey et al. (2002), *Nature*, 418(6893), 38-9 (гидродинамическая трансфекция); Xia et al. (2002), *Nature Biotechnol.*, 20(10), 1006-10 (вирус-опосредованная доставка); или Putnam (1996), *Am. J. Health Syst. Pharm.* 53(2), 151-160, erratum at *Am. J. Health Syst. Pharm.* 53(3), 325 (1996).

[0355] Агенты сайленсинга РНК также можно вводить любым способом, подходящим для введения агентов нуклеиновых кислот, например, ДНК-вакцины. К таким способам относятся генные пушки, биоинжекторы и кожные пластыри, а также безыгольные способы, такие как технология микрочастиц ДНК-вакцин, раскрытая в U.S. Pat. No. 6,194,389, и трансдермальная безыгольная вакцинация млекопитающих вакциной в форме порошка, раскрытая в U.S. Pat. No. 6,168,587. Кроме того, возможна интраназальная доставка, как описано, среди прочего, Hamajima et al. (1998), *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 88(2), 205-10. Также можно использовать липосомы (например, описанные в патенте США № 6472375) и микроинкапсулирование. Также можно использовать биоразлагаемые системы адресной доставки микрочастиц (например, как описано в патенте США № 6471996).

[0356] В одном варианте осуществления активные соединения получают с носителями, которые защищают соединение от быстрого выведения из организма, например, в виде препаратов с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы приготовления таких составов будут очевидны для специалистов в данной области техники. Материалы можно приобрести на коммерческой основе у Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомальные суспензии (включая липосомы, нацеленные на инфицированные клетки, с моноклональными антителами к вирусным антигенам) также можно использовать в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Их можно получить способами, известными специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № № 4522811.

[0357] Особенно выгодно составлять пероральные или парентеральные композиции

в стандартной дозированной форме для простоты введения и единообразия дозировки. Единичная дозированная форма, используемая в данном документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве разовых доз для субъекта, подлежащего лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанного на получение желаемого терапевтического эффекта в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация единичных дозированных форм по изобретению продиктована и напрямую зависит от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, а также от ограничений, присущих области составления такого активного соединения для лечения индивида.

[0358] Токсичность и терапевтическую эффективность таких соединений можно определить с помощью стандартных фармацевтических процедур на культурах клеток или экспериментальных животных, например, для определения LD50 (доза, смертельная для 50% населения) и ED50 (доза, терапевтически эффективная для 50% населения). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс и может быть выражено как соотношение LD50/ED50. Предпочтительны соединения, которые демонстрируют высокие терапевтические индексы. Хотя могут использоваться соединения, которые проявляют токсичные побочные эффекты, следует позаботиться о разработке системы доставки, которая нацеливает такие соединения на участок пораженной ткани, чтобы свести к минимуму потенциальное повреждение неинфицированных клеток и, тем самым, уменьшить побочные эффекты.

[0359] Данные, полученные в результате анализов на клеточных культурах и исследований на животных, могут быть использованы при определении диапазона доз для применения у людей. Дозировка таких соединений предпочтительно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, включающих ED50, с небольшой токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, используемого в способе по изобретению, терапевтически эффективную дозу можно первоначально оценить на основе анализов на клеточных культурах. Доза может быть составлена на животных моделях для достижения диапазона концентраций в циркулирующей плазме, включающего EC50 (т.е. концентрацию тестируемого соединения, при которой достигается полумаксимальный ответ), определенную в клеточной культуре. Такая информация может быть использована для более точного определения полезных доз для человека. Уровни в плазме можно измерить, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

[0360] Фармацевтические композиции могут быть включены в контейнер, упаковку или дозатор вместе с необязательными инструкциями по введению.

[0361] Путь доставки может зависеть от заболевания пациента. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления субъекту с диагнозом ПЭ, послеродовой ПЭ,

эклампсии и/или HELLP можно вводить агент сайленсинга РНК против sFlt1, по настоящему изобретению путем внутривенного или подкожного введения. В дополнение к агенту сайленсинга РНК по настоящему изобретению, пациенту можно назначить вторую терапию, например, паллиативную терапию и/или терапию, специфичную для заболевания. Вторичная терапия может быть, например, симптоматической (например, для облегчения симптомов), защитной (например, для замедления или остановки прогрессирования заболевания) или восстановительной (например, для обращения вспять процесса заболевания). Для лечения ПЭ, послеродовой ПЭ, эклампсии и/или HELLP, например, симптоматическая терапия может дополнительно включать препараты атиенолол, гидралазин, лабеталол, сульфат магния, метилдопа, никардипин, нифедипин, нитропруссид натрия и тому подобное.

[0362] В общем, агент сайленсинга РНК, по настоящему изобретению можно вводить любым подходящим способом. В контексте данного документа под местной доставкой понимается непосредственное нанесение агента сайленсинга РНК на любую поверхность тела, включая глаза, слизистую оболочку, поверхности полостей тела или любую внутреннюю поверхность. Составы для местного применения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, спреи и жидкости. Необходимыми или желательными могут быть обычные фармацевтические носители, водные, порошковые или масляные основы, загустители и тому подобное. Местное введение также можно использовать в качестве средства избирательной доставки агента сайленсинга РНК в эпидермис или дерму субъекта, или в его определенные слои, или в нижележащие ткани.

[0363] Составы для парентерального введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Внутрижелудочковую инъекцию можно облегчить, например, с помощью внутрижелудочкового катетера, прикрепленного к резервуару. При внутривенном применении следует контролировать общую концентрацию растворенных веществ, чтобы сделать препарат изотоническим.

[0364] В контексте данного документа фразы «стереохимически изомерные формы», «стереоформы», «стереоизоформы», «стереоизомеры» и т.п. относятся к различным соединениям, состоящим из одних и тех же атомов, связанных одной и той же последовательностью связей, но имеющих разные трех-размерные структуры, которые не являются взаимозаменяемыми. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, содержащие агенты РНКи (например, дцРНК), могут представлять собой или включать чистые препараты отдельных стереохимически изомерных форм агентов РНКи. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут представлять собой или включать смеси двух или более стереохимически изомерных форм агентов РНКи.

VII. Наборы

[0365] В некоторых других аспектах в изобретении предложены наборы, которые

включают подходящий контейнер, содержащий фармацевтический состав агента сайленсинга РНК, например, агента, сайленсинга двухцепочечной РНК, или агента мРНК (например, предшественника, например, агента сайленсинга более крупной РНК, который можно процессировать в агент мРНК, или ДНК, которая кодирует агент сайленсинга РНК, например, агент сайленсинга двухцепочечной РНК, или агент мРНК, или его предшественник). В некоторых вариантах осуществления отдельные компоненты фармацевтического состава могут находиться в одном контейнере. Альтернативно, может быть желательно обеспечить компоненты фармацевтического состава отдельно в двух или более контейнерах, например, один контейнер для агента сайленсинга РНК, а другой, по меньшей мере, для соединения-носителя. Набор может быть упакован в несколько различных конфигураций, например, один или несколько контейнеров в одной коробке. Различные компоненты можно комбинировать, например, в соответствии с инструкциями, входящими в набор. Компоненты можно комбинировать в соответствии с описанным в данном документе способом, например, для приготовления и введения фармацевтической композиции. В набор также может входить устройство доставки.

[0366] Специалистам в данной области техники будет очевидно, что другие подходящие модификации и адаптации описанных в данном документе способов могут быть выполнены с использованием подходящих эквивалентов, не выходя за рамки раскрытых в данном документе вариантов осуществления. Теперь, после подробного описания некоторых вариантов осуществления, они будут более понятны из следующих примеров, которые приведены только в целях иллюстрации и не являются ограничивающими.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Предпосылки и значение преэклампсии (ПЭ)

[0367] Неопровержимые данные эпидемиологических и экспериментальных исследований в настоящее время указывают на то, что ПЭ вызвана повышенными уровнями «растворимых белков-ловушек» (растворимых FLT1 (sFLT1s)) из гена *Flt1* (*VEGFR1*) в кровотоке матери (Young, B.C., Levine, R.J. & Karumanchi, S.A. Pathogenesis of preeclampsia. *Annual review of pathology* 5, 173-192 (2010); Maynard, S.E. et al. Избыток растворимой в плаценте fms-подобной тирозинкиназы 1 (sFlt1) может способствовать эндотелиальной дисфункции, гипертензии и протеинурии при преэклампсии. *The Journal of clinical investigation* 111, 649-658 (2003); Levine, R.J. et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *The New England journal of medicine* 350, 672-683 (2004); Heydarian, M. et al. Novel splice variants of sFlt1 are upregulated in preeclampsia. *Placenta* 30, 250-255 (2009)). FLT1 представляет собой рецептор тирозинкиназы (RTK), преимущественно экспрессируемый в плаценте. Общим механизмом модуляции RTK является образование укороченных секретируемых форм рецептора, которые действуют как доминантные негативные регуляторы всего сигнального пути. Секвестрация лиганда такими растворимыми ловушками ингибирует внутриклеточную передачу сигналов полноразмерным рецептором, тем самым снижая чувствительность системы к

концентрации лиганда (Vorlova, S. et al. Induction of antagonistic soluble decoy receptor tyrosine kinases by intronic polyA activation. *Molecular cell* 43, 927-939 (2011)). В случае FLT1 растворимые ловушки экспрессируются из укороченных мРНК, генерируемых полиаденилированием в двух интронах (i13 и i15) выше экзонов, кодирующих трансмембранный (ТМ) и киназный домены fl-FLT1.

[0368] У млекопитающих FLT1 преимущественно экспрессируется в плаценте, при этом уровни мРНК Flt1 в плаценте человека в 10-100 раз выше, чем уровни, наблюдаемые в других тканях взрослого организма (Cerdeira, A.S. & Karumanchi, S.A. Ангиогенные факторы при преэклампсии и связанных с ней расстройствах). *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2 (2012)). Если у небеременных взрослых людей во всех тканях преобладает полноразмерная изоформа (*Id.*), то в плаценте экспрессируются три усеченные изоформы: sFlt1-i13 короткая, sFlt1-i13 длинная и sFlt1-i15a, каждая из которых кодирует белки sFLT1. Такая же картина высокого уровня Flt1 в плаценте и низкой экспрессии в других тканях небеременных взрослых наблюдается у грызунов. Однако, поскольку у грызунов отсутствует сайт полиаденилирования интрона 14, они экспрессируют только одну растворимую форму-ловушку: sFlt1-i13. При ПЭ как полноразмерные (fl-Flt1), так и усеченные мРНК Flt1 накапливаются в плаценте до более высоких уровней, чем при нормальной беременности, при этом усеченные изоформы выражены еще сильнее. Эти изменения на уровне мРНК, вероятно, объясняют значительное повышение уровня белков sFLT1 в кровотоке матери во время ПЭ.

Применимость миРНК для лечения ПЭ

[0369] Предыдущая работа продемонстрировала применимость терапевтических средств на основе миРНК для лечения ПЭ (патент США № 9862952, включенный в настоящий документ посредством ссылки).

Пример 2. Оптимизация миРНК, нацеленных на sFLT1.

[0370] Оптимизация ранее описанных миРНК была проведена для усиления сайленсинга, одновременно способствуя накоплению плацентарной ткани, минимизации деградации миРНК и снижению токсичности. Оптимизацию проводили путем введения каркаса, богатого 2'-ОМе, для повышения стабильности и конъюгированной смысловой цепи PC-DCA для улучшенной доставки через плаценту. Оптимизированные миРНК продемонстрировали повышенное накопление, эффективность и безопасность по сравнению с ранее разработанными химическими препаратами.

[0371] Оптимизация содержания 2'ОМе

[0372] Как показано на фиг. 1А, различные количества модификаций 2'ОМе были использованы в антисмысловой и смысловой цепи миРНК. Как показано на фиг. 1В, были получены результаты дозового ответа (n=3, среднее ± СО) миРН, нацеленных на последовательность гена *flt1* человека в положении 2283 (5' CTCTCGGATCTCCAAATTТА 3' (SEQ ID NO: 1). миРН, нацеленные на положение 2519 (5' CATCATAGCTACCATTТATT 3' (SEQ ID NO: 2), также были протестированы с аналогичными результатами. Клетки HeLa, обработанные миРНК в указанных

концентрациях, в течение 72 часов. Уровни мРНК измеряли с помощью системы Dual-Glo® Luciferase Assay System и рассчитывали как процент от необработанного контроля (С). Таблица фиг. 1В - Макс. KD (%) - максимальный процент нокдауна мРНК-мишени при максимальной лечебной дозе миРНК, IC50 - половина максимальной ингибирующей концентрации, AUC - площадь под кривой доза-ответ, величина р - значимость. Результаты показывают, что увеличение количества модификаций 2'ОМе в составе миРНК не приводит к существенному снижению сайленсинг-эффективности указанных миРНК. Модификации 2'ОМе менее токсичны, чем модификации 2'F. Соответственно, миРНК, богатые 2'ОМе, могут быть более подходящими для терапевтического применения.

[0373] Оптимизация конъюгата смысловой цепи

[0374] Конъюгат миРНК играет важную роль в направлении миРНК к соответствующим тканям и клеткам. Как показано на фиг. 2А, Су3-меченные миРНК были конъюгированы с различными функциональными фрагментами, а доставку в ткани печени, почек и плаценты контролировали с помощью флуоресцентной визуализации тканей. В этом исследовании беременным мышам CD1 вводили 20 мг/кг вариантов миРНК, меченных Су3. Флуоресцентную визуализацию тканей проводили с помощью инвертированного наклонного микроскопа Leica DMi8. 10-кратные мозаичные изображения. Масштабная линейка=2 мм. Все изображения получены при одинаковой интенсивности лазера. Как показано на фиг. 2В, накопление направляющей цепи оценивали количественно через 48 часов с помощью анализа гибридизации РНК (n=3). Значения р описывают статистически значимые различия между каждым соединением и соединением, конъюгированным с холестерином (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA; ** p<0,01; *** p<0,001; статистически незначимые различия не отмечены). NOC - нет конъюгата, Chol - холестерин, DCA - докозановая кислота, PC-DCA - фосфохолин-докозановая кислота, DHA - докозагексановая кислота, PC-DHA - фосфохолин-докозагексановая кислота, DIO - двухразветвленный олигонуклеотид. Результаты показывают, что конъюгаты миРНК PC-DCA демонстрируют повышенное накопление в плаценте.

[0375] Конъюгаты PC-DCA миРНК были дополнительно охарактеризованы как демонстрирующие снижение накопления в костном мозге. Проводили FACS-анализ клеток костного мозга мышей CD-1, которым вводили варианты миРНК sFLT1_2283, меченные Су3. На фиг. 3А изображена схема гейтирования, используемая для количественной оценки интенсивности Су3 в определенных популяциях клеток костного мозга на фиг. 3В - фиг. 3D. На фиг. 3В представлена гистограмма частотного распределения интенсивности флуоресценции Су3 (слева) и диаграммы средней интенсивности флуоресценции Су3 (справа) нейтрофилов костного мозга через 24 часа после инъекции вариантов миРНК. На фиг. 3С представлена гистограмма частотного распределения интенсивности флуоресценции Су3 (слева) и диаграммы средней интенсивности флуоресценции Су3 (справа) гранулоцитов костного мозга через 24 часа

после инъекции вариантов миРНК. На фиг. 3D представлена гистограмма частотного распределения интенсивности флуоресценции Су3 (слева) и диаграммы средней интенсивности флуоресценции Су3 (справа) моноцитов костного мозга через 24 часа после инъекции вариантов миРНК. ($n=3$, среднее \pm СО) значения p описывают статистически значимые различия между соединениями (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA; * $p<0,05$; статистически незначимые различия не отмечены). Результаты показывают, что миРНК, конъюгированная с PC-DCA, демонстрирует меньшую аккумуляцию в моноцитах, гранулоцитах и нейтрофилах костного мозга, демонстрируя, что конъюгат PC-DCA полезен для плацентарной доставки с минимальным нецелевым накоплением.

[0376] Оптимизация 5'-конца антисмысловой цепи

[0377] Антисмысловые цепи могут быть чувствительны к действию 5'-экзонуклеаз. Поэтому выгодно защитить 5' конец модификацией, чтобы уменьшить деградацию. Далее миРНК были оптимизированы путем тестирования влияния трех различных антисмысловых модификаций 5' конца: 5' винилфосфоната (VP), 5' фосфоротиоата (PS) и 5'-гидроксила (OH). Схема способов химической модификации миРНК.

[0378] Беременным мышам CD-1 вводили 20 мг/кг эквимольной смеси вариантов миРНК 2283 и 2519 в эмбриональные дни (E) 13 и E14. На фиг. 4A показаны схематические изображения химической структуры инъекцированных соединений миРНК и химические структуры тестируемых 5' фрагментов. Как показано на фиг. 4B, уровни мРНК *sflt1-il3* в плаценте на E18 измеряли с помощью Quantigene 2.0 RNA Assay. Уровни были нормализованы по *Flt1* и представлены как процент от контроля PBS ($n=5$, среднее \pm СО).

[0379] Оптимизация 5'-фрагмента, схемы модификации 2' и конъюгата привела к увеличению накопления в тканях и повышению эффективности *in vivo*. Как показано на фиг. 4C, количество накопления миРНК в плаценте на E18 измеряли с помощью анализа гибридизации РНК ($n=5$). Значения p описывают статистически значимые различия между соединениями (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA; ** $p<0,01$; **** $p<0,0001$; статистически незначимые различия не отмечены). Как показано на фиг. 4D, уровни мРНК *sflt1-il3* в плаценте на E18 измеряли с помощью Quantigene 2.0 RNA Assay. Уровни были нормализованы по *Flt1* и представлены как процент от контроля PBS ($n=6$, среднее \pm СО). Как показано на фиг. 4E, количество накопления миРНК в плаценте на E18 измеряли с помощью анализа гибридизации РНК ($n=6$). Значения p описывают статистически значимые различия между соединениями (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA; ** $p<0,01$; **** $p<0,0001$; статистически незначимые различия не отмечены). Непарный t-тест; # $p<0,05$; ##### $p<0,0001$). Как показано на фиг. 4F, среднее количество детенышей мыши, средний вес детенышей и средний вес плаценты были примерно одинаковыми у контрольных и обработанных беременных мышей, что указывает на то, что смесь 2283 и 2519 миРНК не оказывала негативного влияния на эти показатели.

[0380] Снижение выработки сывороточных цитокинов

[0381] Оптимизированные миРНК тестировали на предмет их влияния на продукцию цитокинов в сыворотке крови. Оптимизированные миРНК были созданы, в частности, для снижения токсичности и расширения терапевтического индекса. Снижение выработки сывороточных цитокинов будет свидетельствовать о снижении токсичности и более широком терапевтическом индексе.

[0382] Как показано на фиг. 5, были измерены уровни сывороточных цитокинов у мышей CD-1 через 24 часа после инъекции 75 мг/кг вариантов миРНК sFLT1_2283 ($n=3$, среднее \pm CO). Значения p описывают статистически значимые различия между соединениями (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$; статистически незначимые различия не отмечены). Были измерены уровни многих интерлейкинов, колониестимулирующего фактора и хемокинов, которые оказались ниже при использовании оптимизированных миРНК второго поколения по сравнению с миРНК первого поколения. Более широкий терапевтический индекс означает, что миРНК можно вводить в высоких концентрациях без риска возникновения проблем токсичности. Это может привести к снижению частоты введения и/или лучшему сайленсингу sFLT-1.

[0383] Общие результаты примера 2 показывают, что оптимизированные миРНК, нацеленные на сайты-мишени *sFlt-1* 2283 и 2519, по сравнению с миРНК первого поколения, имели схожую эффективность сайленсинга при превосходном накоплении в плацентарной ткани, снижении накопления вне целевой ткани, снижении деградации, снижении токсичности и более широком терапевтическом индексе.

[0384] Системы анализа для оценки соединений лидеров

[0385] На данный момент разработаны следующие анализы и модели.

Оценка распределения тканей *in situ* с помощью флуоресцентной микроскопии

[0386] Были синтезированы варианты гмиРНК с красителем Су3 или Су5.5 (более низкая автофлуоресценция), присоединенным через неразрушаемый линкер к 5' концу смысловой (пассажирской) цепи. Это соединение было биологически стабильным без заметного расщепления Су3 в течение 24 часов. Флуоресцентную смысловую цепь, гибридованную с ее комплементарной направляющей цепью (формируя таким образом двухцепочечную гмиРНК), вводили животным и исследовали характер распределения олигонуклеотидов в срезах ткани толщиной 4 мкм, также окрашенных DAPI и/или селективными антителами к типу клеток. Параллельные срезы можно окрашивать стандартными гистологическими маркерами, что позволяет получить детальное гистологическое картирование. Поскольку гмиРНК уже сильно гидрофобно модифицированы, добавление красителя мало влияет на общую гидрофобность и, следовательно, минимально влияет на распределение олигонуклеотидов. Этот анализ позволил быстро оценить распределение тканей и типов клеток и был дополнен количественным анализом на основе ПНК для прямого обнаружения направляющей цепи.

Гибридизация ПНК для количественного обнаружения направляющих цепей в тканевых лизатах

[0387] Для прямой количественной оценки интактной направляющей цепи в тканях, был разработан и реализован новый анализ, в котором направляющую цепь гибридизовали с полностью комплементарным Су3-меченным олигонуклеотидом ПНК (пептидная нуклеиновая кислота), а соответствующий дуплекс отделяли от избытка одноцепочечной ПНК с помощью ВЭЖХ. Поскольку ПНК не имеет заряда и чрезвычайно прочно связывается с направляющей цепью, она превосходит как смысловую цепь гмиРНК, так и любые эндогенные целевые последовательности. Флуоресцентное обнаружение гибрида Су3-ПНК:направляющая цепь позволило напрямую измерить содержание направляющей цепи в тканевых лизатах. В сочетании с автоматическим инжектором ВЭЖХ этот анализ позволил провести количественный анализ направляющих цепей в сотнях образцов за ночь. Кроме того, анализ обладает высокой чувствительностью, предел обнаружения составляет менее 10 фмоль/грамм, а гибриды, содержащие полноразмерную, частично деградированную, 5'-фосфорилированную и 5'-дефосфорилированную направляющую цепь, можно количественно определить в виде отдельных пиков или плеч в следовом анализе ВЭЖХ. Поскольку этот анализ может обнаруживать как меченые, так и немеченые соединения, его можно напрямую использовать в будущих СРО для анализа клинических образцов.

Анализ QuantiGene® (Affymetrix) для прямого обнаружения вариантов мРНК Flt1 в клетках и тканях

[0388] QuantiGene® представляет собой высокочувствительный 96-луночный анализ, в котором мРНК выявляют напрямую путем амплификации сигнала непосредственно из тканевых и/или клеточных лизатов. Благодаря соединению этого анализа с автоматическим анализатором TissueLyser на 192 лунки, была разработана высокопроизводительная версия, позволяющая обрабатывать десятки образцов на одно животное. Таким образом, количественные данные об экспрессии целевых и вспомогательных генов были получены сразу у многих животных. В пилотных исследованиях n=8 было достаточно для обнаружения 40% модуляции экспрессии изоформы мРНК sFlt1 с достоверностью 80%. Способы разветвленной ДНК гибридизации (bДНК) описаны Coles et al. *Nucleic Acid Ther.* (2015) Nov 23. PMID: 26595721.

ИФА (#MVR100, R&D Systems) для обнаружения белков sFLT1 в кондиционированных средах и крови

[0389] Для этого анализа на 96 лунках требовалось всего 10 мкл биологической жидкости на образец. Этот анализ оптимизировали на протяжении многих лет для исследований как *in vitro* так и *in vivo*. Он совместим с клиническими условиями и позволяет оценивать уровень циркулирующего белка sFLT1 без умерщвления животных, что будет особенно полезно для исследований на нечеловеческих приматах.

Модель нормальной беременности мыши

[0390] Варианты *sFlt1-i13* экспрессируются во время беременности мыши, причем уровень *i13* экспоненциально возрастает с 14 по 19 день. Идеальная гомология между соединением sFLT1-i13-2283 и мышинным вариантом *i13* позволяет изучать как

эффективность, так и безопасность на этой простой модели грызунов.

Модели преэклампсии

[0391] Модель пониженного перфузионного давления матки (RUPP) плацентарной ишемии и модель преэклампсии с гипоксией используют, как описано ниже.

Модель беременности бабуина дикого типа

[0392] Вариант sFlt1-i15a не экспрессируется у грызунов во время беременности, поэтому общая эффективность и безопасность комбинации будет оцениваться на беременных бабуинах дикого типа с использованием ELISA, неинвазивного анализа для определения эффективности.

Пример 3. Оптимизированные миРНК, нацеленные на *sFlt-1 in vitro* и в RUPP крысиной модели преэклампсии

[0393] Оптимизированные миРНК, нацеленные на *sFlt-1*, были протестированы *in vitro* на клеточной линии человека и на крысиной модели преэклампсии RUPP. В этом примере использовались следующие миРНК:

	Последовательность	Молекулярная формула натриевой соли	Молекулярная формула свободной кислоты
sFLT-2283	Комбинированная смысловая и антисмысловая цепь	$C_{434}H_{527}F_{15}N_{150}Na_{40}O_{250}P_{40}S_{13}$	$C_{434}H_{567}F_{15}N_{150}O_{250}P_{40}S_{13}$
sFLT-2283 Антисмысловая цепь	V(mU)#(fA)#(mA)(fA)(fU)(fU)(mU)(fG)(mG)(fA)(mG)(fA)(mU)(fC)#(mC)#(fG)#(mA)#(mG)#(mA)#(fG)#(mA)	$C_{215}H_{239}F_{10}N_{86}Na_{22}O_{125}P_{21}S_9$	$C_{215}H_{261}F_{10}N_{86}O_{125}P_{21}S_9$
sFLT-2283 Смысловая цепь	(mC)#(mG)#(mG)(fA)(mU)(fC)(mU)(fC)(mC)(fA)(mA)(mA)(mU)(fU)#(mU)#(mA)(T)(T)-PCDCA	$C_{219}H_{288}F_5N_{64}Na_{18}O_{125}P_{19}S_4$	$C_{219}H_{306}F_5N_{64}O_{125}P_{19}S_4$
	Последовательность	Молекулярная формула натриевой соли	Молекулярная формула свободной кислоты
sFLT-2519	Комбинированная смысловая и антисмысловая цепь	$C_{433}H_{524}F_{15}N_{145}Na_{40}O_{252}P_{40}S_{13}$	$C_{433}H_{564}F_{15}N_{145}O_{252}P_{40}S_{13}$
sFLT-2519 Антисмыслов	V(mU)#(fA)#(mU)(fA)(fA)(fA)(mU)(fG)(mG)(fU)(mA)(fG)(mC	$C_{214}H_{237}F_{10}N_{82}Na_{22}O_{127}P_{21}S_9$	$C_{214}H_{259}F_{10}N_{82}O_{127}P_{21}S_9$

ая цепь)(fU)#(mA)#(fU)#(mG)#(mA)#(mU)#(fG)#(mA)		
sFLT-2519 Смысловая цепь	(mA)#(mU)#(mA)(fG)(mC)(fU)(mA)(fC)(mC)(fA)(mU)(mU)(mU)(fA)#(mU)#(mA)(T)(T)-PCDCA	C ₂₁₉ H ₂₈₇ F ₅ N ₆₃ N a ₁₈ O ₁₂₅ P ₁₉ S ₄	C ₂₁₉ H ₃₀₅ F ₅ N ₆₃ O ₁ 25P ₁₉ S ₄

Условные обозначения: m=2'-О-метил; f=2'-фтор; T=Тимидин; #=фосфоротиоат; V=5'-винилфосфонат; PCDCA=3'-С7-фосфохолин-докозановой кислоте, конъюгированной через фосфатный линкер.

[0394] На фиг. 9, фиг. 10А-фиг. 10В и фиг. 11А-фиг. 11В представлены оптимизированные миРНК, нацеленные на sFlt-1 (sFLT-2283 и sFLT-2519).

[0395] Оптимизированные миРНК тестировали на клеточной линии человека WM-115 для анализа способности миРНК-2283 и миРНК-2519 подавлять свои мишени. миРНК-2283 (мишени *sFLT1-il3*) и миРНК-2519 (мишени *sFLT1-e15a*) тестировали отдельно или в комбинации в соотношении 1:1. Как показано на фиг. 7, каждая миРНК в отдельности была способна подавить свою целевую изоформу мРНК *sFLT1* и снизить общие уровни белка sFLT1, в то время как комбинация продемонстрировала еще большее подавление отдельных изоформ и общее снижение уровня белка.

[0396] Те же самые миРНК тестировали в комбинации на крысиной модели преэклампсии RUPP (модель пониженной маточно-плацентарной перфузии у беременных крыс). Процедура RUPP вызывает плацентарную ишемию и является хорошо изученной моделью преэклампсии. У крыс RUPP наблюдаются характерные симптомы преэклампсии, включая повышение среднего артериального давления матери (САД) и снижение скорости гломерулярной фильтрации (СГФ), что сопровождается повышенными уровнями sFLT1.

[0397] Для оценки оптимизированных миРНК, нацеленных на *sFlt1* в модели RUPP, крысам подкожно вводили 10 мг/кг от массы тела комбинированной миРНК терапии (миРНКsFLT1: (смесь 1:1 миРНК-2283 (нацеливание на *sFLT1-il3* нацеливание на) и миРНК -2519 (*sFLT1-e15a*))) или контроль PBS на 13-й и 14-й дни беременности (см. фиг. 8А).

[0398] Для создания модели RUPP беременным крысам Sprague Dawley на 14-й день беременности хирургическим путем накладывали серебряные клипсы вокруг брюшной аорты и яичниковых артерий в матке. В качестве контроля использовали фиктивные операции (разрезы брюшной полости и наложение швов без установки клипс).

[0399] Кровь и ткани собирали на 19-й день беременности и анализировали биометрические показатели беременности. Кровяное давление измеряли у находящихся в сознании крыс на 19-й день беременности, а затем животных анестезировали изофлураном для получения крови для измерения sFLT-1 и забора тканей для гистологического анализа.

[0400] Были проведены следующие анализы:

Измерение артериального давления у матери: на 18-й день беременности были имплантированы каротидные катетеры для измерения артериального давления в сознании и частоты сердечных сокращений на 19-й день.

Вес плода и плаценты: на 19-й день беременности во время терминального умерщвления измеряли вес плода и плаценты. Общий и средний вес плода и плаценты рассчитывали для каждой крысы.

Поглощение плода: визуально определите количество плодов, поглощенных матерью.

[0401] Как показано на фиг. 8B, кровяное давление матери снизилось в группе комбинированной терапии RUPP, в результате чего кровяное давление достигло контрольных уровней (Имитация). Более того, вес плаценты сохранялся в группе RUPP, получавшей комбинированную терапию (фиг. 8B). По показателям поглощения и веса плода (см. фиг. 8C) не было выявлено никаких негативных последствий для плода и наблюдалась тенденция к улучшению его роста.

Эквиваленты

[0402] Раскрытие может быть воплощено в других конкретных формах, не отступая от его сущности или существенных характеристик. Таким образом, вышеизложенные варианты осуществления следует рассматривать во всех отношениях как иллюстративные, а не ограничивающие изобретение. Следовательно, объем описания указан в прилагаемой формуле изобретения, а не в предшествующем описании, и все изменения, которые подпадают под значение и диапазон эквивалентности формулы изобретения, должны быть включены в ее объем.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, где каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

(1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' СТСТСГГАТСТССААТТТА 3' (SEQ ID NO:1) или

5' САТСАТАГСТАССАТТТАТТ 3' (SEQ ID NO:2);

(2) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов;

(3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 50% 2'-О-метильных модификаций;

(4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16 и 20 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами;

(5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей;

(6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи;

(7) длина смысловой цепи составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов;

(8) смысловая цепь содержит по меньшей мере 65% 2'-О-метильных модификаций;

(9) нуклеотиды в любом из нескольких положений 4, 6, 8, 10 и 14 от 5'-конца смысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; и

(10) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

2. Двухцепочечная РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, где каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

(1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' СТСТСГГАТСТССААТТТА 3' (SEQ ID NO:1) или

5' САТСАТАГСТАССАТТТАТТ 3' (SEQ ID NO:2);

(2) антисмысловая цепь содержит чередующиеся 2'-метоксирибонуклеотиды и 2'-фторрибонуклеотиды;

(3) нуклеотиды в положениях 2 и 14 от 5' конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами;

(4) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-7 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей;

(5) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи;

(6) смысловая цепь содержит чередующиеся 2'-метоксирибонуклеотиды и 2'-фторрибонуклеотиды; и

(7) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

3. Молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, где каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

(1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' СТСТСГГАТСТССАААТТТА 3' (SEQ ID NO:1) или

5' САТСАТАГСТАССАТТТАТТ 3' (SEQ ID NO:2);

(2) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов;

(3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 50% 2'-О-метильных модификаций;

(4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16 и 18 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами;

(5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей;

(6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи;

(7) длина смысловой цепи составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов;

(8) смысловая цепь содержит по меньшей мере 80% 2'-О-метильных модификаций;

(9) нуклеотиды в любом из нескольких положений 7, 9 и 11 от 5'-конца смысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; и

(10) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

4. Молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, где каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

(1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' СТСТСГГАТСТССАААТТТА 3' (SEQ ID NO:1) или

5' САТСАТАГСТАССАТТТАТТ 3' (SEQ ID NO:2);

(2) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов;

(3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 70% 2'-О-метильных модификаций;

(4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2, 4, 5, 6, 8 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами;

(5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей;

(6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи;

(7) длина смысловой цепи составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов;

(8) смысловая цепь содержит 100% 2'-О-метильных модификаций; и

(9) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

5. Молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, где каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

(1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' СТСТСГГАТСТССААТТТА 3' (SEQ ID NO:1) или

5' САТСАТАГСТАССАТТТАТТ 3' (SEQ ID NO:2);

(2) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов;

(3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 75% 2'-О-метильных модификаций;

(4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2, 4, 5, 6 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами;

(5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей;

(6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи;

(7) длина смысловой цепи составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов;

(8) смысловая цепь содержит 100% 2'-О-метильных модификаций; и

(9) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

6. Молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, где каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

(1) антисмысловая цепь содержит последовательность, по существу комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты 5' СТСТСГГАТСТССААТТТА 3' (SEQ ID NO:1) или

5' САТСАТАГСТАССАТТТАТТ 3' (SEQ ID NO:2);

(2) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов;

(3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 85% 2'-О-метильных модификаций;

(4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами;

(5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей;

(6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи;

(7) длина смысловой цепи составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов;

(8) смысловая цепь содержит 100% 2'-О-метильных модификаций; и

(9) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

7. дцРНК по любому из пп. 1-6, где длина антисмысловой цепи составляет 20 нуклеотидов.

8. дцРНК по любому из пп. 1-6, где длина антисмысловой цепи составляет 21 нуклеотид.
9. дцРНК по любому из пп. 1-6, где длина антисмысловой цепи составляет 22 нуклеотида.
10. дцРНК по любому из пп. 1-6, где длина смысловой цепи составляет 15 нуклеотидов.
11. дцРНК по любому из пп. 1-6, где длина смысловой цепи составляет 16 нуклеотидов.
12. дцРНК по любому из пп. 1-6, где длина смысловой цепи составляет 18 нуклеотидов.
13. дцРНК по любому из пп. 1-6, где длина смысловой цепи составляет 20 нуклеотидов.
14. дцРНК по любому из пп. 1-6, содержащая двухцепочечную область, насчитывающую от 15 до 20 пар оснований.
15. дцРНК по любому из пп. 1-6, содержащая двухцепочечную область из 15 пар оснований.
16. дцРНК по любому из пп. 1-6, содержащая двухцепочечную область из 16 пар оснований.
17. дцРНК по любому из пп. 1-6, содержащая двухцепочечную область из 18 пар оснований.
18. дцРНК по любому из пп. 1-6, содержащая двухцепочечную область из 20 пар оснований.
19. дцРНК по любому из пп. 1-18, где указанная дцРНК содержит тупой конец.
20. дцРНК по любому из пп. 1-19, где указанная дцРНК содержит по меньшей мере один выступающий одноцепочечный нуклеотид.
21. дцРНК по п. 20, где указанная дцРНК содержит выступающий одноцепочечный нуклеотид, насчитывающий от около 2 до 5 нуклеотидов.
22. дцРНК по любому из пп. 1-21, содержащая 4-16 фосфориотатных межнуклеотидных связей.
23. дцРНК по любому из пп. 1-21, содержащая 8-13 фосфориотатных межнуклеотидных связей.
24. дцРНК по любому из пп. 1-23, где смысловая цепь содержит одно или несколько несоответствий нуклеотидов между антисмысловой цепью и смысловой цепью.
25. дцРНК по любому из пп. 1-24, где антисмысловая цепь содержит 5'-фосфат, 5'-алкилфосфонат, 5'-алкиленфосфонат или 5'-алкенилфосфонат.
26. дцРНК по п. 25, где антисмысловая цепь содержит 5'-винилфосфонат.
27. дцРНК по любому из пп. 1-26, где функциональный фрагмент связан с 3'-концом смысловой цепи.
28. дцРНК по п. 27, где функциональный фрагмент включает гидрофобный фрагмент.

29. дцРНК по п. 28, где гидрофобный фрагмент выбран из группы, состоящей из жирных кислот, стероидов, секостероидов, липидов, ганглиозидов, аналогов нуклеозидов, эндоканнабиноидов, витаминов и их смесей.

30. дцРНК по п. 29, где стероид выбран из группы, состоящей из холестерина и литохолевой кислоты (LCA).

31. дцРНК по п. 29, где жирная кислота выбрана из группы, состоящей из эйкозапентаеновой кислоты (ЕРА), докозагексаеновой кислоты (DHA) и докозановой кислоты (DCA).

32. дцРНК по п. 29, где витамин выбран из группы, состоящей из холина, витамина А, витамина Е и их производных или метаболитов.

33. дцРНК по любому из пп. 27-32, где функциональный фрагмент связан со смысловой цепью с помощью линкера.

34. дцРНК по п. 33, где линкер представляет собой расщепляемый линкер.

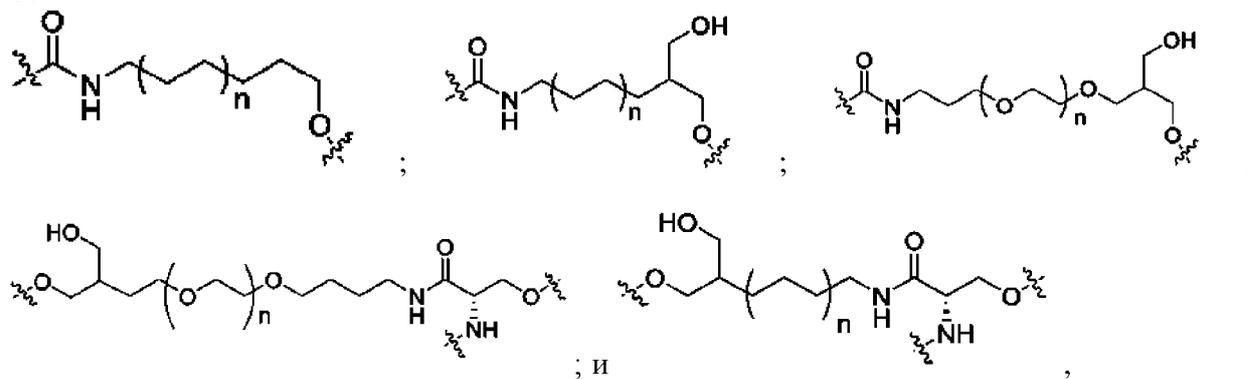
35. дцРНК по п. 34, где расщепляемый линкер содержит фосфодиэфирную связь, дисульфидную связь, кислотолабильную связь или фоторасщепляемую связь.

36. дцРНК по п. 34 или 35, где расщепляемый линкер содержит динуклеотид dTdT с фосфодиэфирными межнуклеотидными связями.

37. дцРНК по п. 35, где кислотолабильная связь включает β -тиопропионатную связь или связь карбоксидиметилмалеинового ангидрида (CDM).

38. дцРНК по любому из пп. 33-37, где линкер включает двухвалентный или трехвалентный линкер.

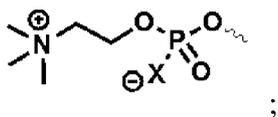
39. дцРНК по п. 38, где двухвалентный или трехвалентный линкер выбран из группы, состоящей из:



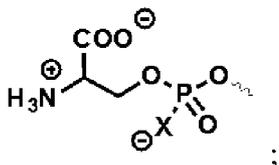
40. дцРНК по любому из пп. 33-39, где линкер включает цепь этиленгликоля, алкильную цепь, пептид, РНК, ДНК, фосфодиэфир, фосфоротиоат, фосфорамидат, амид, карбамат или их комбинацию.

41. дцРНК по любому из пп. 38-40, где, когда линкер представляет собой трехвалентный линкер, линкер дополнительно связывает фосфодиэфир или производное фосфодиэфира.

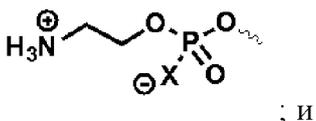
42. дцРНК по п. 41, где фосфодиэфир или производное фосфодиэфира выбраны из группы, состоящей из:



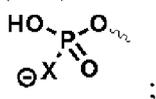
(Zc1);



(Zc2);



(Zc3)



(Zc4)

где X представляет собой O, S или BH₃.

43. дцРНК по любому из пп. 1-42, где нуклеотиды в положениях 1 и 2 от 3'-конца смысловой цепи и нуклеотиды в положениях 1 и 2 от 5'-конца антисмысловой цепи соединены с соседними рибонуклеотидами через фосфоротиоатные связи.

44. дцРНК по любому из пп. 1-43, где указанная область комплементарности комплементарна по меньшей мере 15, 16, 17 или 18 смежным нуклеотидам SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

45. дцРНК по любому из пп. 1-43, где указанная область комплементарности содержит не более 3 несоответствий с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

46. дцРНК по любому из пп. 1-43, где указанная область комплементарности полностью комплементарна SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

47. дцРНК по любому из пп. 1-46, где антисмысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' UAAAUUUGGAGAUCCGAGAGA 3', а смысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' CGGAUCUCCAAAAUUUA 3'.

48. дцРНК по любому из пп. 1-46, где антисмысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' UAUAAAUGGUAGCUAUGAUGA 3', а смысловая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5' AUAGCUACCAUUUAUA 3'.

49. дцРНК по любому из пп. 1-46, где экспрессия белка sFLT1 в клетке или организме снижается по меньшей мере на около 20%.

50. Способ лечения или контроля ПЭ, послеродовой ПЭ, эклампсии или синдрома HELLP, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении или контроле,

терапевтически эффективного количества дцРНК по любому из пп. 1-48.

51. Способ по п. 50, в котором фармацевтическую композицию вводят внутривенно или подкожно.

52. Способ по п. 50, в котором экспрессия белка sFLT1 снижается у субъекта по меньшей мере на около 20%.

53. Способ лечения одного или нескольких симптомов ПЭ, послеродовой ПЭ, эклампсии или синдрома HELLP у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту дцРНК по любому из пп. 1-48.

54. Способ лечения одного или более симптомов ангиогенного расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту дцРНК по любому из пп. 1-48.

55. Способ по п. 54, в котором ангиогенное расстройство выбрано из группы, состоящей из ПЭ, послеродовой ПЭ, эклампсии и синдрома HELLP.

56. Фармацевтическая композиция, содержащая:

первую дцРНК, включающую первую смысловую цепь и первую антисмысловую цепь, где первая антисмысловая цепь содержит область комплементарности, которая по существу комплементарна SEQ ID NO: 1, при этом первая дцРНК включает дцРНК по любому из пп. 1-46;

вторую дцРНК, включающую вторую смысловую цепь и вторую антисмысловую цепь, где вторая антисмысловая цепь содержит область комплементарности, которая по существу комплементарна SEQ ID NO: 2, при этом вторая дцРНК содержит дцРНК по любому из пп. 1-46; и

фармацевтически приемлемый носитель.

57. Фармацевтическая композиция, содержащая:

первую дцРНК, включающую первую смысловую цепь и первую антисмысловую цепь, где каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом первая антисмысловая цепь содержит область комплементарности, которая по существу комплементарна SEQ ID NO: 1;

вторую дцРНК, включающую вторую смысловую цепь и вторую антисмысловую цепь, где каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом вторая антисмысловая цепь содержит область комплементарности, которая по существу комплементарна SEQ ID NO: 2; и

фармацевтически приемлемый носитель, причем для каждой из первой дцРНК и второй дцРНК:

(1) длина антисмысловой цепи составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов;

(3) антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 50% 2'-О-метильных модификаций;

(4) нуклеотиды в любом одном или нескольких из положений 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16 и 20 от 5'-конца антисмысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами;

(5) нуклеотиды в положениях с 1-2 по 1-8 от 3'-конца антисмысловой цепи

соединены друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей;

- (6) часть антисмысловой цепи комплементарна части смысловой цепи;
- (7) длина смысловой цепи составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов;
- (8) смысловая цепь содержит по меньшей мере 65% 2'-О-метильных модификаций;
- (9) нуклеотиды в любом из нескольких положений 4, 6, 8, 10 и 14 от 5'-конца

смысловой цепи не являются 2'-метоксирибонуклеотидами; и

(10) нуклеотиды в положениях 1-2 от 5'-конца смысловой цепи связаны друг с другом посредством фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

58. Молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, где каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

(1) антисмысловая цепь содержит (mU)#(fA)#(mA)(fA)(fU)(fU)(mU)(fG)(mG)(fA)(mG)(fA)(mU)(fC)#(mC)#(fG)#(mA)#(mG)#(mA)#(fG)#(mA); и

(2) смысловая цепь содержит (mC)#(mG)#(mG)(fA)(mU)(fC)(mU)(fC)(mC)(fA)(mA)(mA)(mU)(fU)#(mU)#(mA),

где «m» соответствует 2'-О-метильной модификации, «f» соответствует 2'-фтор модификации, «#» соответствует фосфоротиоатной межнуклеотидной связи.

59. Молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, где каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

(1) антисмысловая цепь содержит (mU)#(fA)#(mU)(fA)(fA)(fA)(mU)(fG)(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fU)#(mA)#(fU)#(mG)#(mA)#(mU)#(fG)#(mA); и

(2) смысловая цепь содержит (mA)#(mU)#(mA)(fG)(mC)(fU)(mA)(fC)(mC)(fA)(mU)(mU)(mU)(fA)#(mU)#(mA),

где «m» соответствует 2'-О-метильной модификации, «f» соответствует 2'-фтор модификации, «#» соответствует фосфоротиоатной межнуклеотидной связи.

60. дцРНК по п. 58 или 59, где антисмысловая цепь содержит 5'-винилфосфонат.

61. дцРНК по любому из пп. 58-60, содержащая конъюгат докозановой кислоты (DCA), связанный с 3'-концом смысловой цепи.

62. дцРНК по п. 61, где DCA связана со смысловой цепью с помощью линкера.

63. дцРНК по п. 62, где линкер представляет собой расщепляемый линкер.

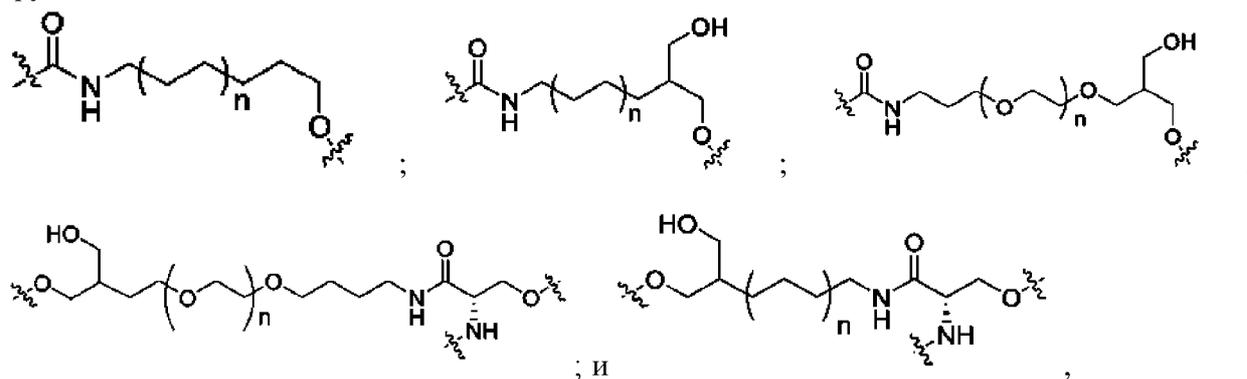
64. дцРНК по п. 63, где расщепляемый линкер содержит фосфодиэфирную связь, дисульфидную связь, кислотолабильную связь или фоторасщепляемую связь.

65. дцРНК по п. 63 или 64, где расщепляемый линкер содержит динуклеотид dTdT с фосфодиэфирными межнуклеотидными связями.

66. дцРНК по любому из пп. 62-65, где линкер включает двухвалентный или трехвалентный линкер.

67. дцРНК по п. 66, где двухвалентный или трехвалентный линкер выбран из

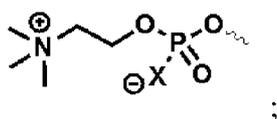
группы, состоящей из:



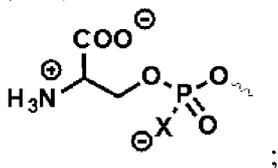
где n равно 1, 2, 3, 4 или 5.

68. дцРНК по любому из пп. 62-67, где, когда линкер представляет собой трехвалентный линкер, линкер дополнительно связывает фосфодиэфир или производное фосфодиэфира.

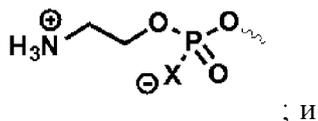
69. дцРНК по п. 68, где фосфодиэфир или производное фосфодиэфира выбрано из группы, состоящей из:



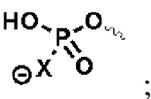
(Zc1);



(Zc2);



(Zc3)



(Zc4)

где X представляет собой O , S или BH_3 .

70. Молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, где каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

(1) антисмысловая цепь содержит $V(mU)\#(fA)\#(mA)(fA)(fU)(fU)(mU)(fG)(mG)(fA)(mG)(fA)(mU)(fC)\#(mC)\#(fG)\#(mA)\#(mG)\#(mA)\#(fG)\#(mA)$; и

(2) смысловая цепь содержит

(mC)#(mG)#(mG)(fA)(mU)(fC)(mU)(fC)(mC)(fA)(mA)(mA)(mU)(fU)#(mU)#(mA)(T)(T)-PCDCA,

где «m» соответствует 2'-О-метильной модификации, «f» соответствует 2'-фтор модификации, «Т» соответствует тимидиновому нуклеотиду ДНК, «#» соответствует фосфоротиоатной межнуклеотидной связи, «V» соответствует 5'-винилфосфонату и «PCDCA» соответствует 3'-С7-фосфохолиндокозановой кислоте, конъюгированной через фосфатный линкер.

71. Молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, где каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

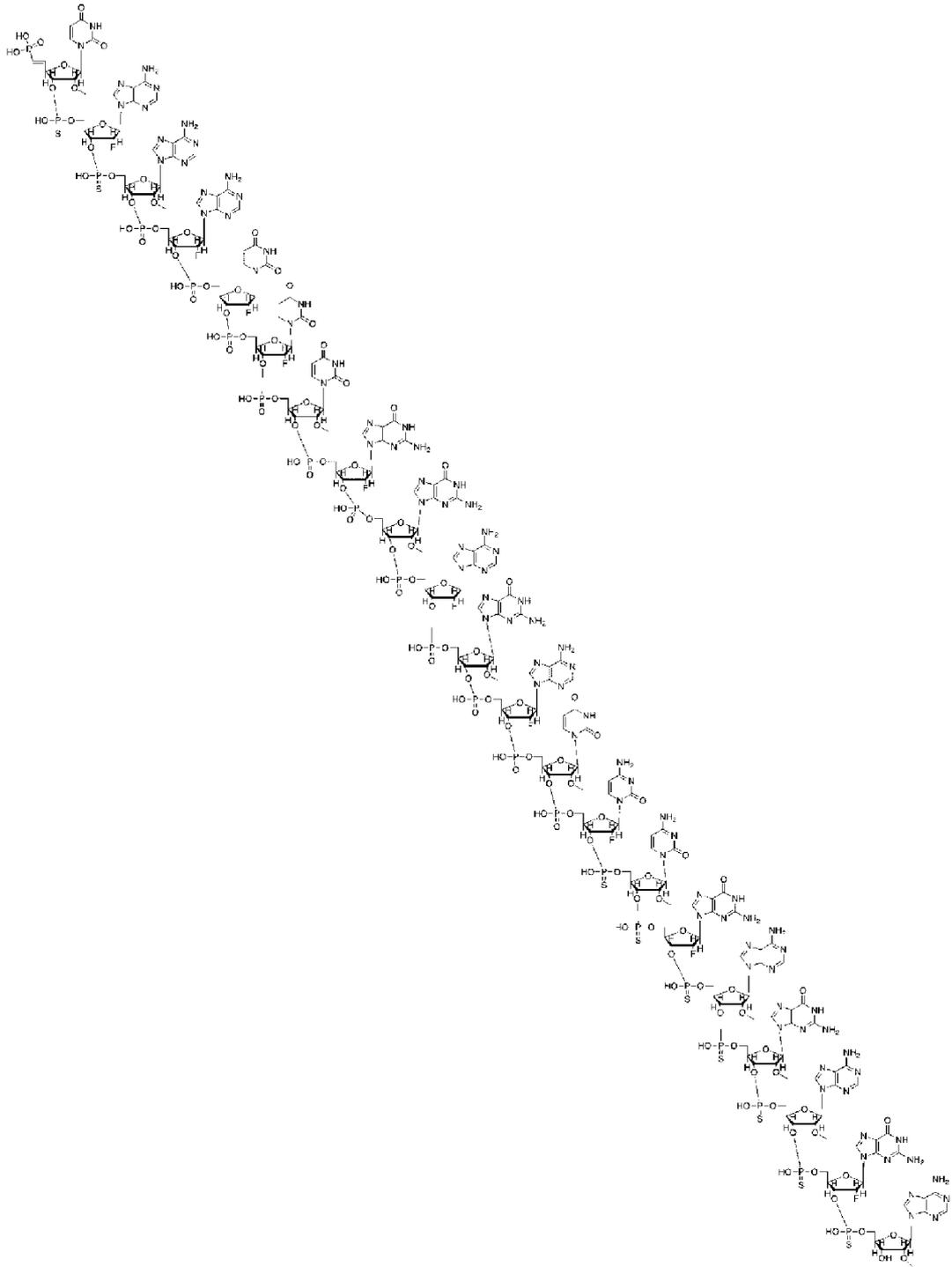
(1) антисмысловая цепь содержит V(mU)#(fA)#(mU)(fA)(fA)(fA)(mU)(fG)(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fU)#(mA)#(fU)#(mG)#(mA)#(mU)#(fG)#(mA); и

(2) смысловая цепь содержит (mA)#(mU)#(mA)(fG)(mC)(fU)(mA)(fC)(mC)(fA)(mU)(mU)(mU)(fA)#(mU)#(mA)(T)(T)-PCDCA,

где «m» соответствует 2'-О-метильной модификации, «f» соответствует 2'-фтор модификации, «Т» соответствует тимидиновому нуклеотиду ДНК, «#» соответствует фосфоротиоатной межнуклеотидной связи, «V» соответствует 5'-винилфосфонату и «PCDCA» соответствует 3'-С7-фосфохолиндокозановой кислоте, конъюгированной через фосфатный линкер.

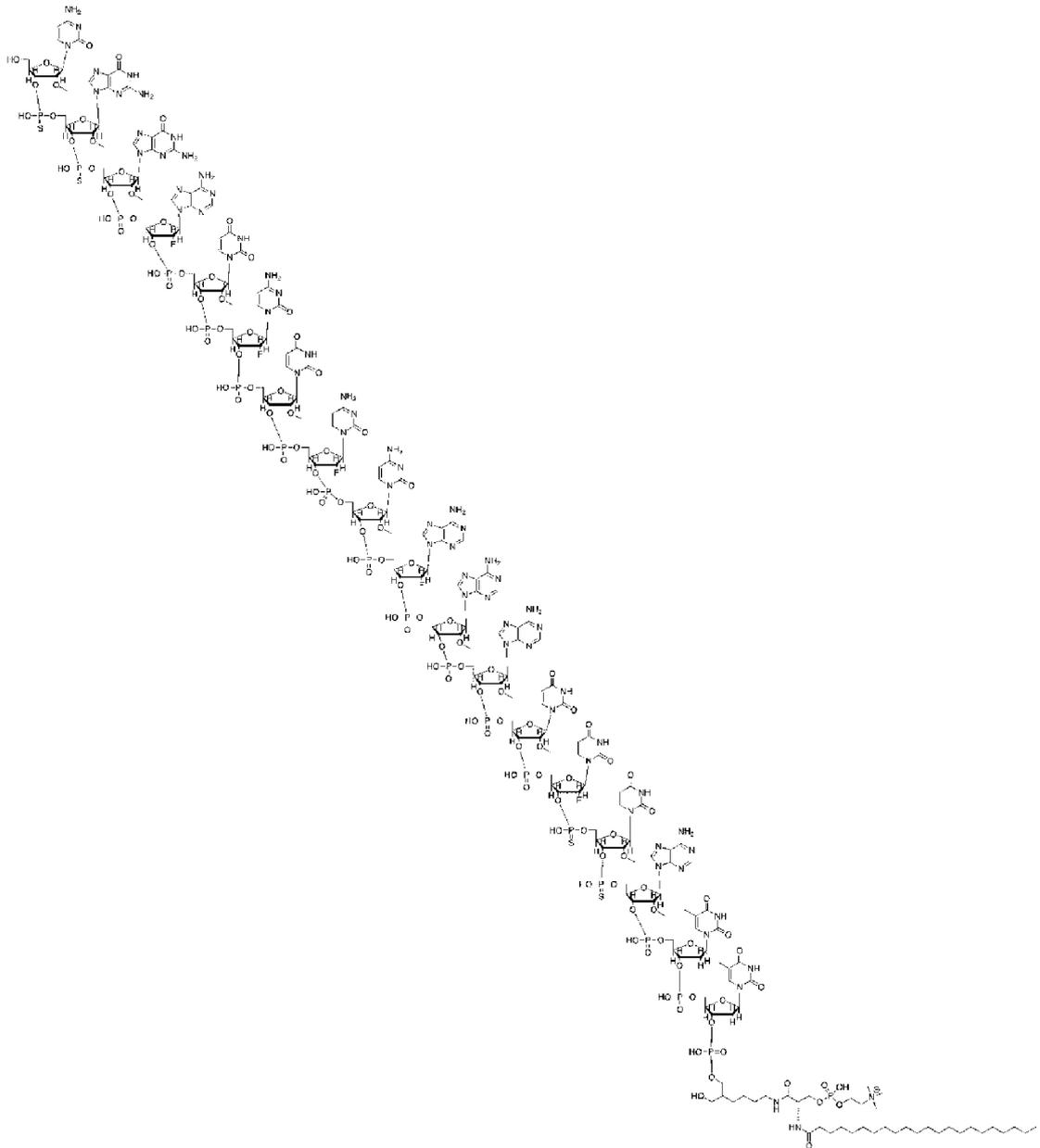
72. Молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, где каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

(1) антисмысловая цепь включает формулу I или ее соль:



Формула I; и

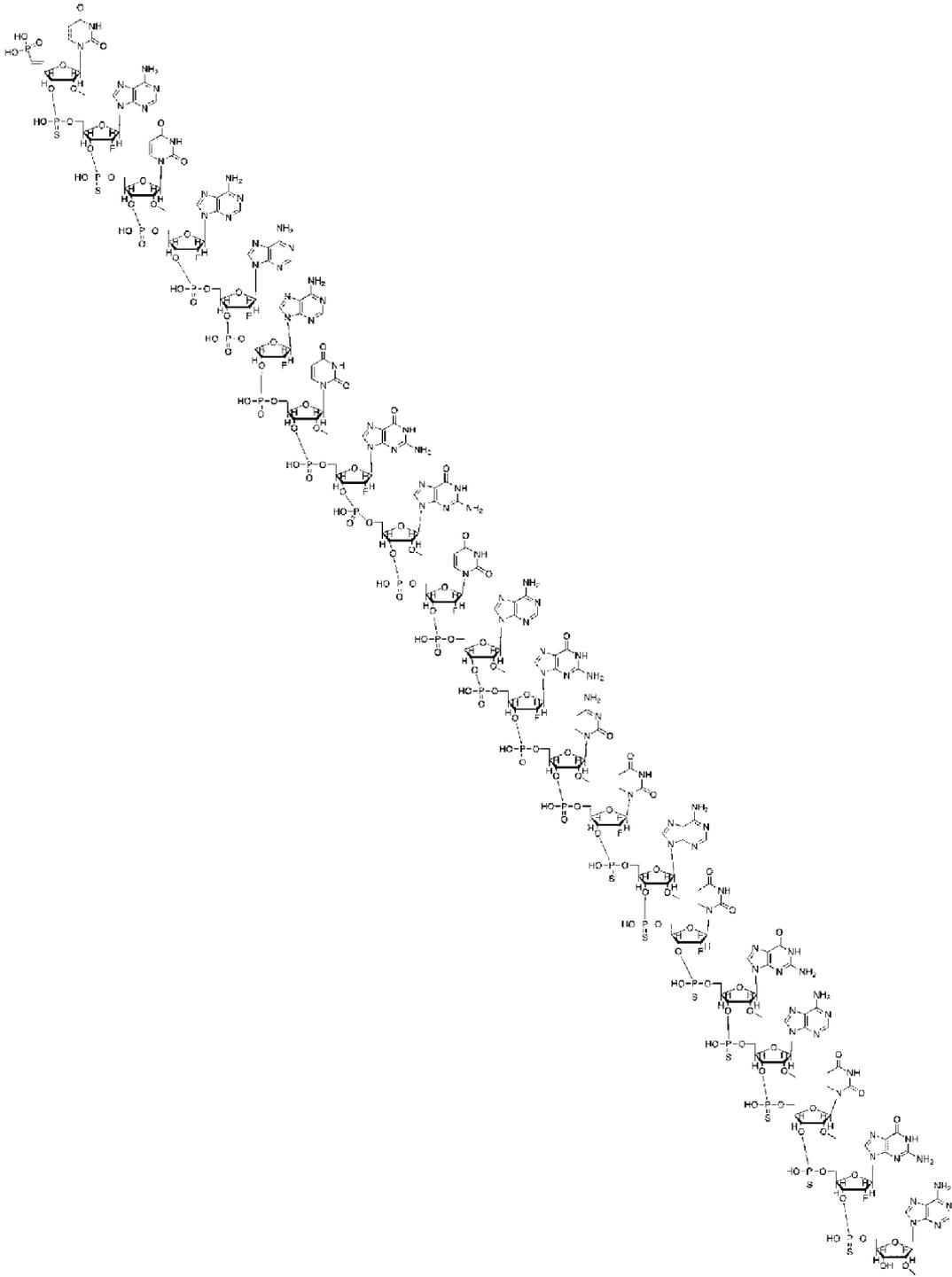
(2) смысловая цепь включает формулу II или ее соль:



Формула II.

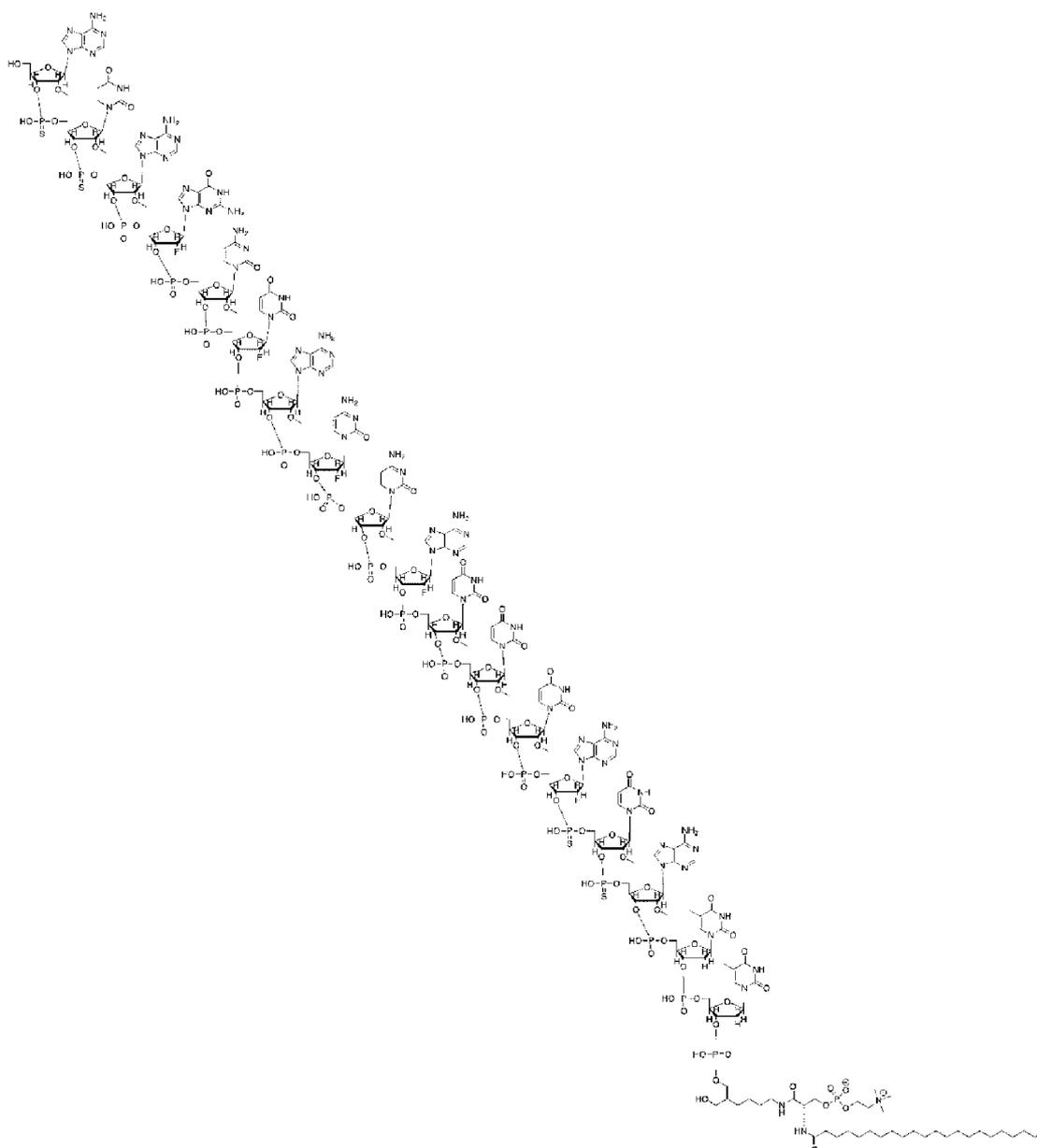
73. Молекула двухцепочечной РНК (дцРНК), причем указанная дцРНК включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, где каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

(1) антисмысловая цепь включает формулу III или ее соль:



Формула III, или ее соль; и

(2) смысловая цепь включает формулу IV или ее соль:



Формула IV.

74. дцРНК по п. 72 или 73, где соль включает натриевую соль или калиевую соль.

75. Способ лечения или контроля ПЭ, послеродовой ПЭ, эклампсии или синдрома HELLP, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении или контроле, терапевтически эффективного количества дцРНК по любому из пп. 58-74.

76. Способ лечения одного или более симптомов ангиогенного расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту дцРНК по любому из пп. 58-74.

77. Фармацевтическая композиция, содержащая:

первую дцРНК, причем указанная первая дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, где каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

(1) антисмысловая цепь содержит V(mU)#(fA)#(mA)(fA)(fU)(fU)(mU)(fG)(mG)(fA)(mG)(fA)(mU)(fC)#(mC)#(fG)#(mA)#(mG)#(mA)#(fG)#(mA); и

(2) смысловая цепь содержит
 (mC)#(mG)#(mG)(fA)(mU)(fC)(mU)(fC)(mC)(fA)(mA)(mA)(mU)(fU)#(mU)#(mA)(T)(T)-
 PCDSA; и

вторую дцРНК, причем указанная вторая дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, где каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

(1) антисмысловая цепь содержит
 V(mU)#(fA)#(mU)(fA)(fA)(fA)(mU)(fG)(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fU)#(mA)#(fU)#(mG)#(mA)
 #(mU)#(fG)#(mA); и

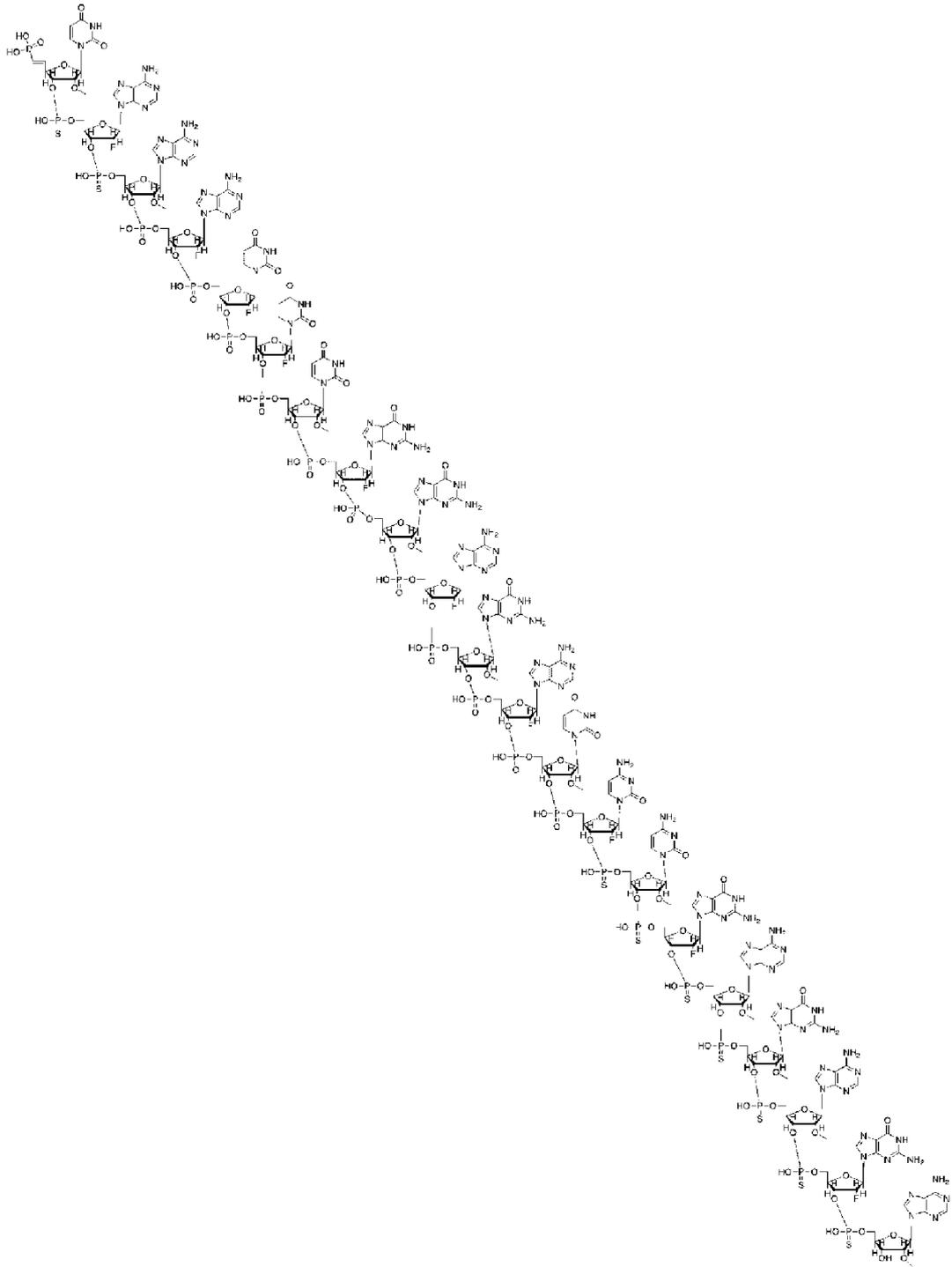
(2) смысловая цепь содержит
 (mA)#(mU)#(mA)(fG)(mC)(fU)(mA)(fC)(mC)(fA)(mU)(mU)(mU)(fA)#(mU)#(mA)(T)(T)-
 PCDSA,

где «m» соответствует 2'-О-метильной модификации, «f» соответствует 2'-фтор модификации, «Т» соответствует тимидиновому нуклеотиду ДНК, «#» соответствует фосфоротиоатной межнуклеотидной связи, «V» соответствует 5'-винилфосфонату и «PCDSA» соответствует 3'-С7-фосфохолиндокозановой кислоте, конъюгированной через фосфатный линкер.

78. Фармацевтическая композиция, содержащая:

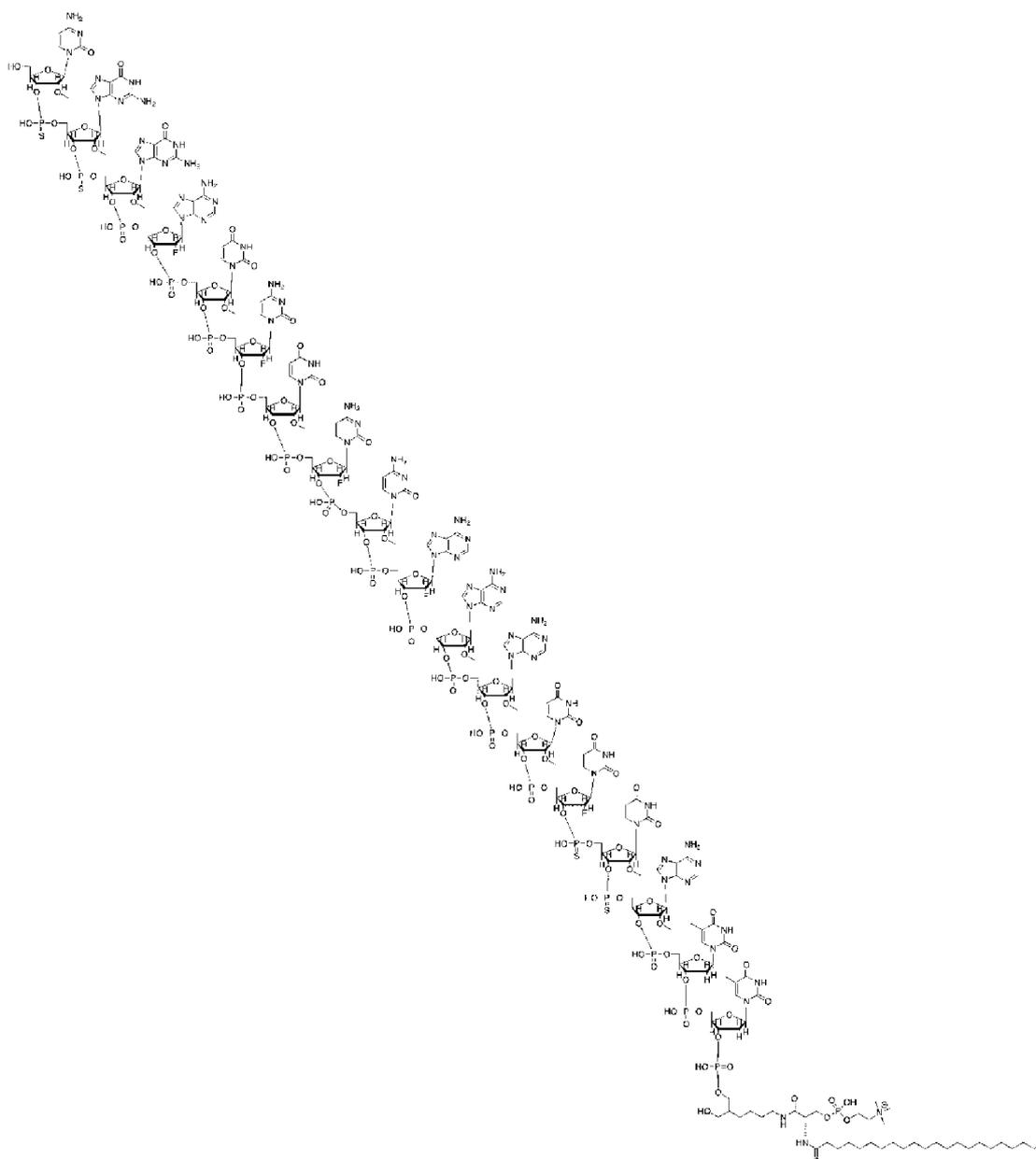
первую дцРНК, причем указанная первая дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, где каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

(1) антисмысловая цепь включает формулу I или ее соль:



Формула I; и

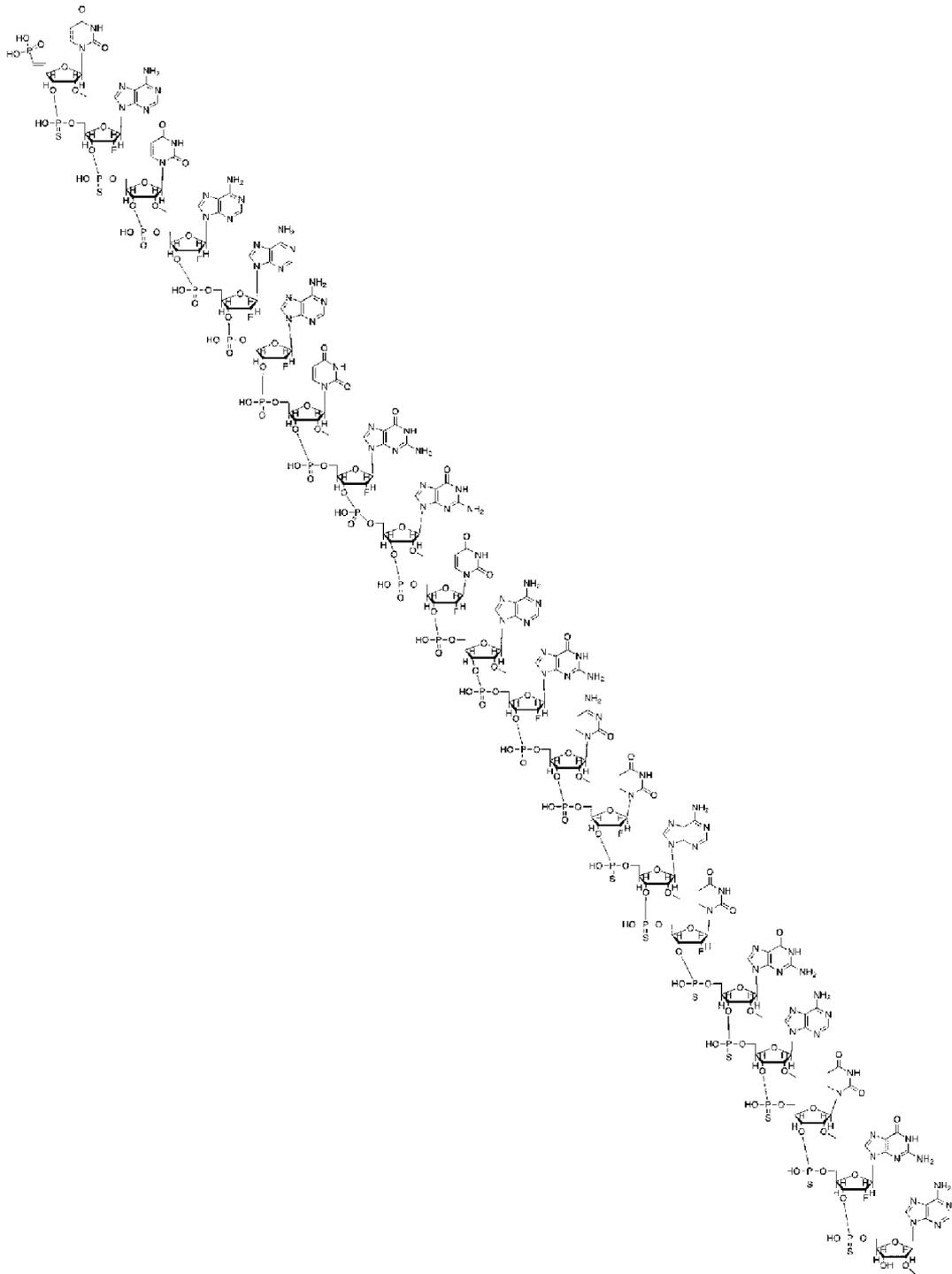
(2) смысловая цепь включает формулу II или ее соль:



Формула II; и

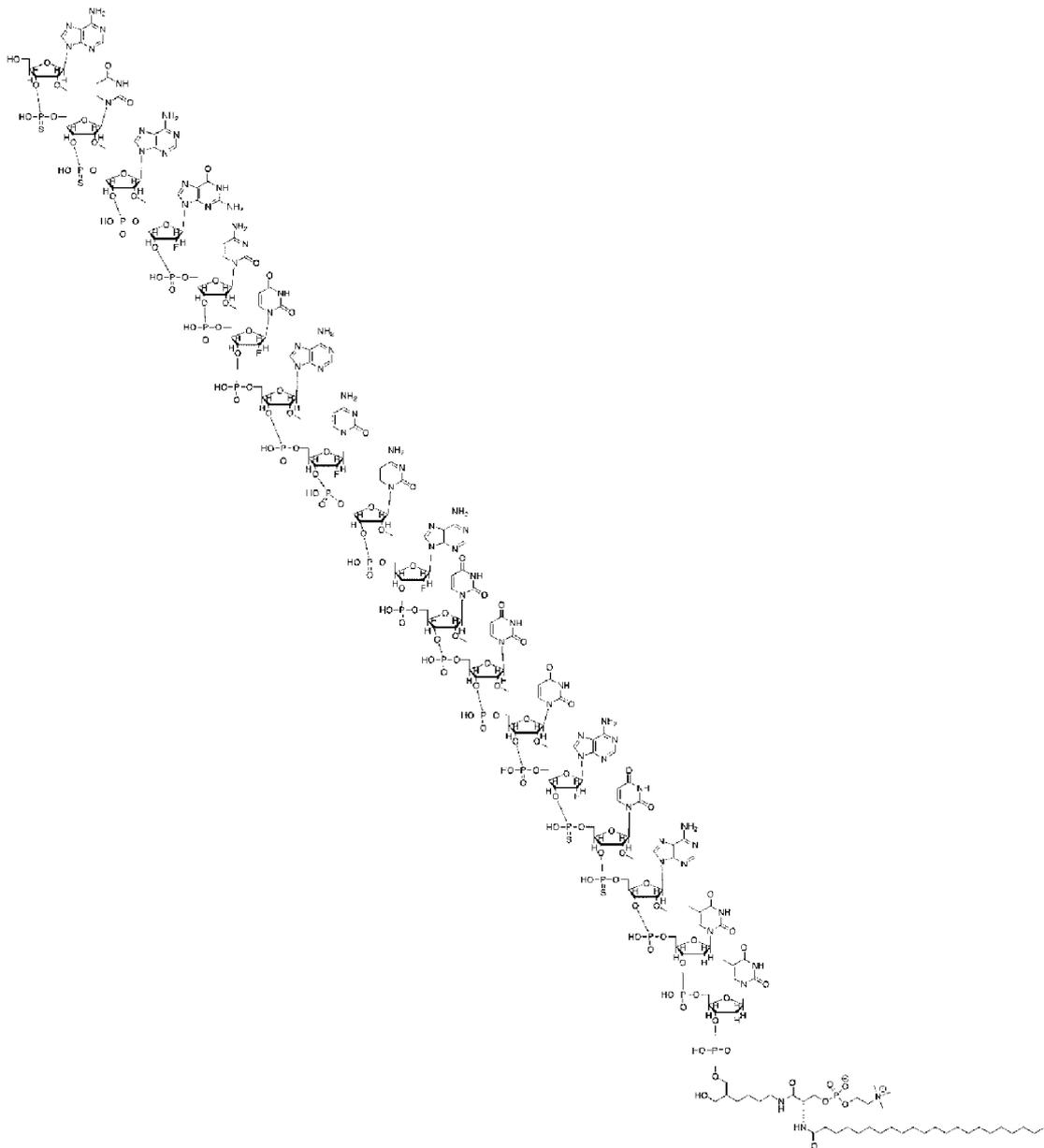
вторую дцРНК, причем указанная вторая дцРНК содержит антисмысловую цепь и смысловую цепь, где каждая цепь имеет 5'-конец и 3'-конец, при этом:

(1) антисмысловая цепь включает формулу III или ее соль:



Формула III; и

(2) смысловая цепь включает формулу IV или ее соль:



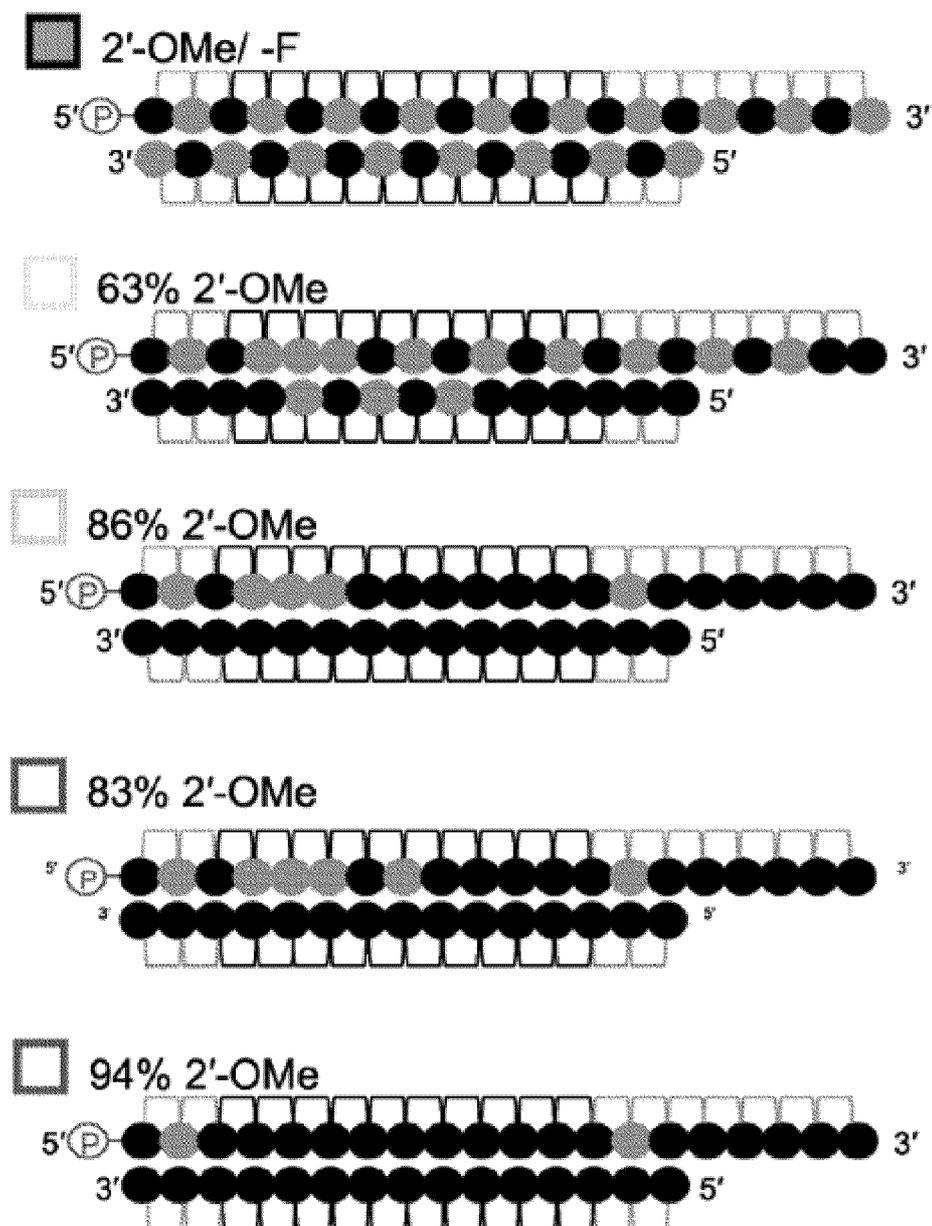
Формула IV.

79. Фармацевтическая композиция по п. 78, где соль включает натриевую соль или калиевую соль.

80. Способ лечения или контроля ПЭ, послеродовой ПЭ, эклампсии или синдрома HELLP, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении или контроле, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 77 или 78.

81. Способ лечения одного или более симптомов ангиогенного расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 77 или 78.

По доверенности



2'-OMe = ●

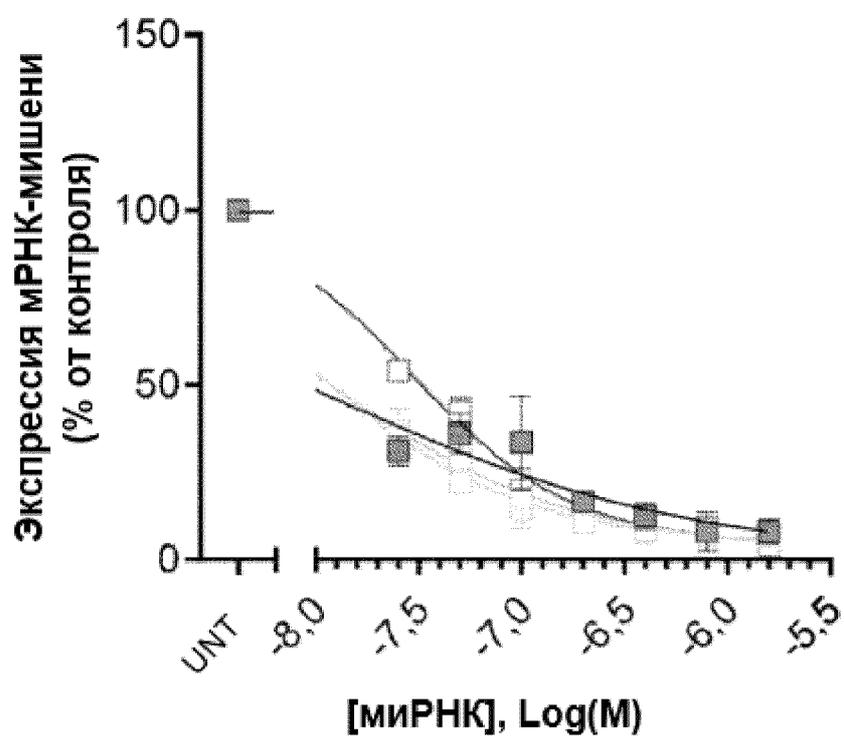
2'-F = ●

Фосфодиэфирная связь = □

Фосфоротиоатная связь = □

5'-фосфатный фрагмент = P

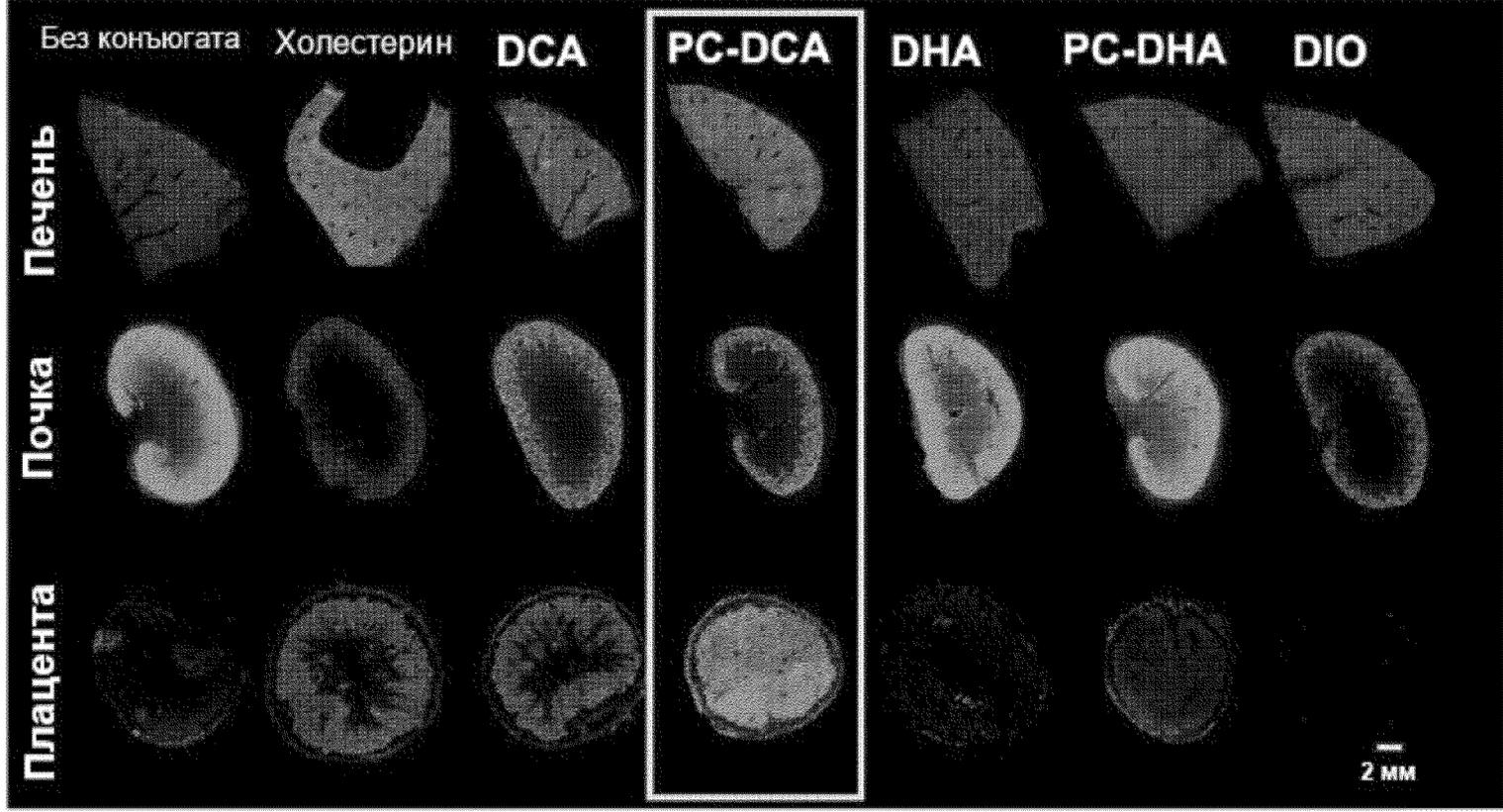
ФИГ. 1А

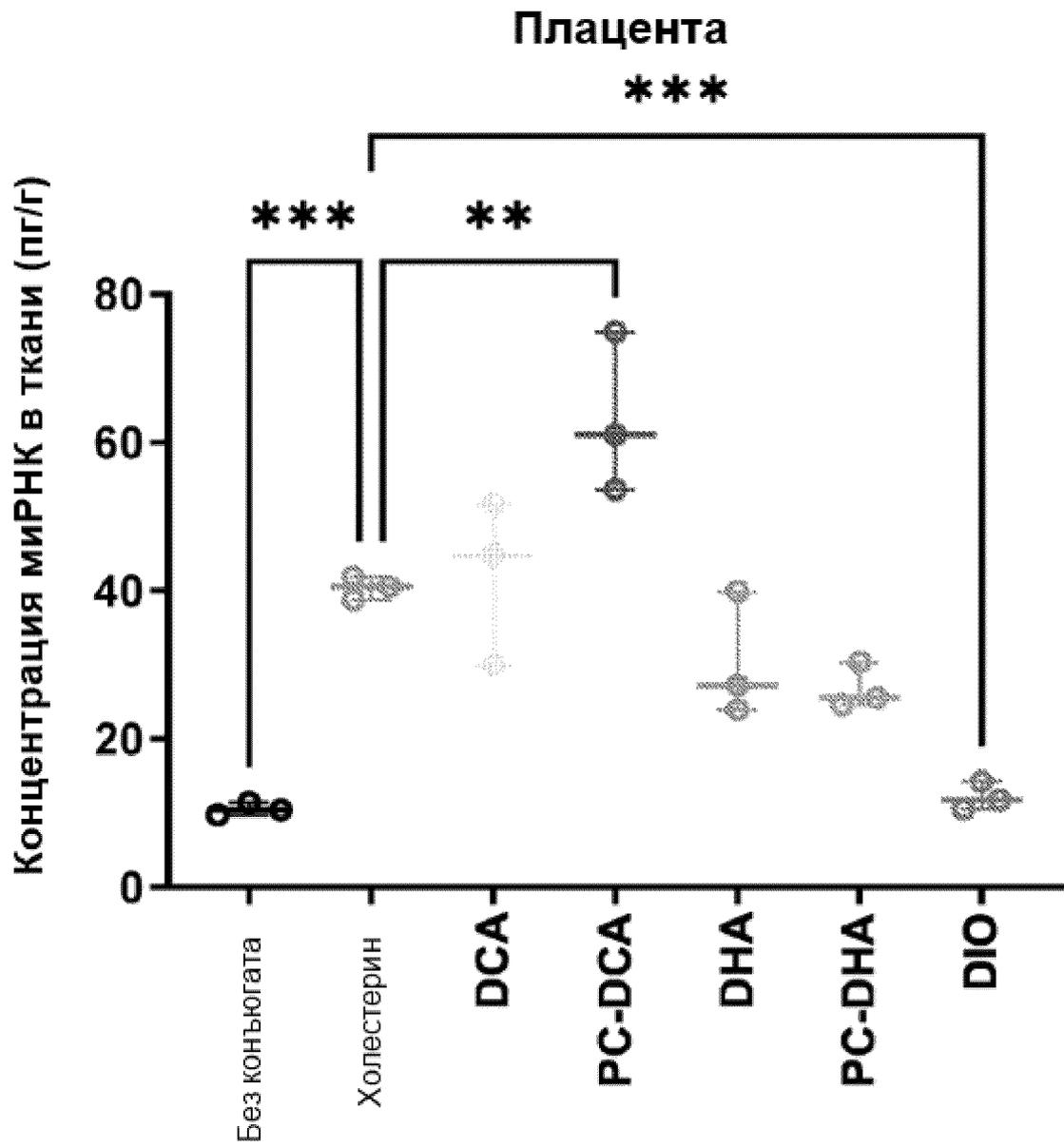


Условное обозначение	Макс. KD (%)	IC ₅₀ (нМ)	AUC	p-значение
■	92	9	392	
□	94	10	392	<0,01
□	96	11	400	<0,05
□	96	30	454	н/з

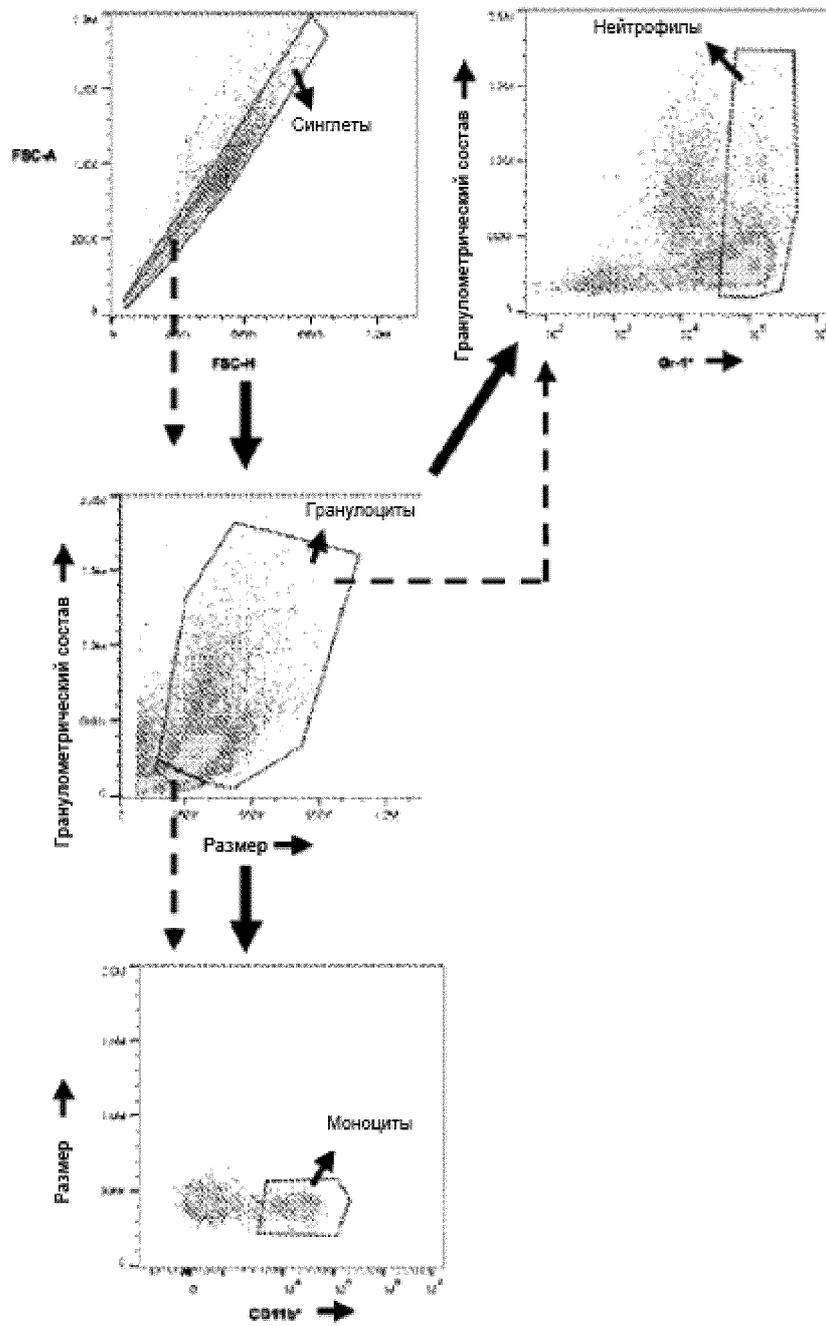
ФИГ. 1В

ФИГ. 2А

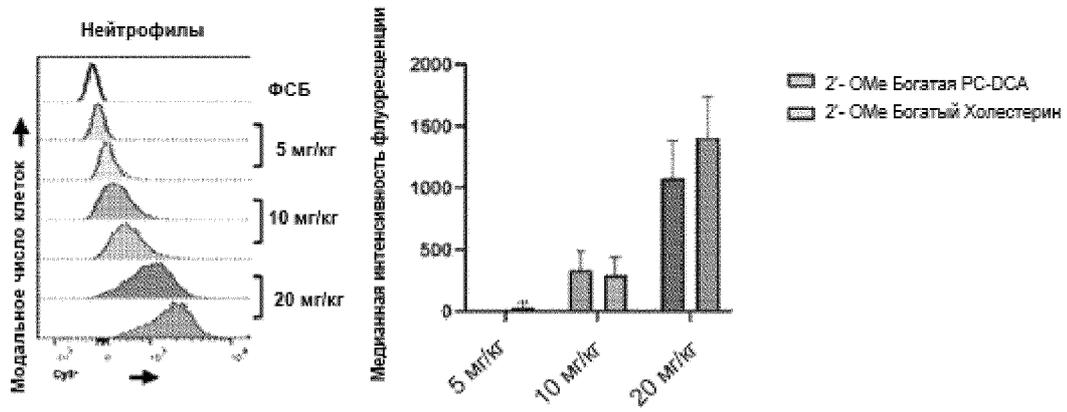




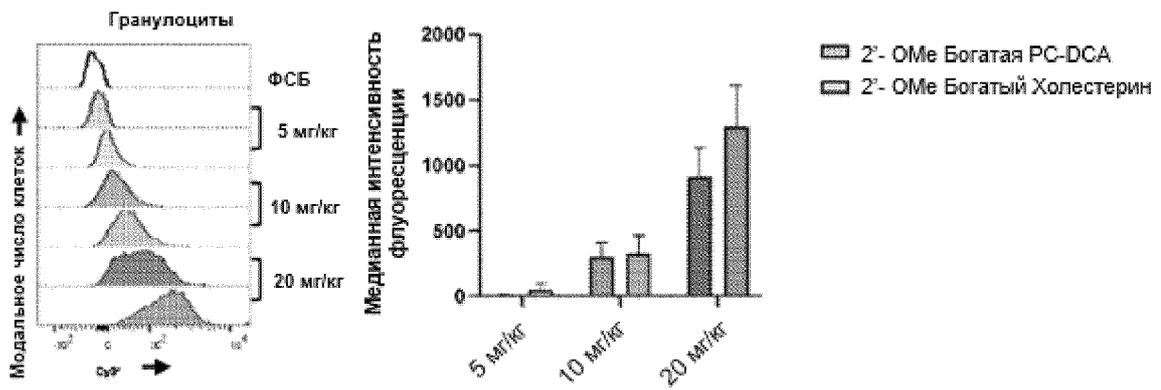
ФИГ. 2В



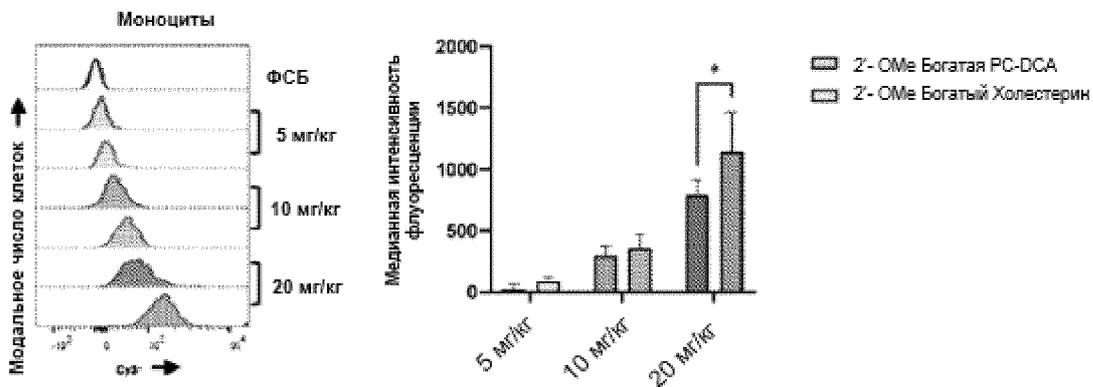
ФИГ. 3А



ФИГ. 3В

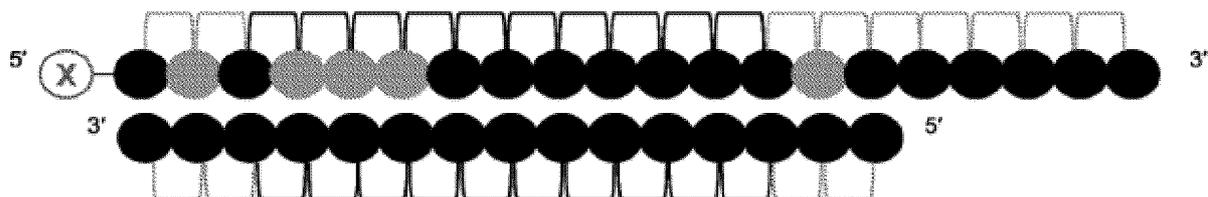


ФИГ. 3С

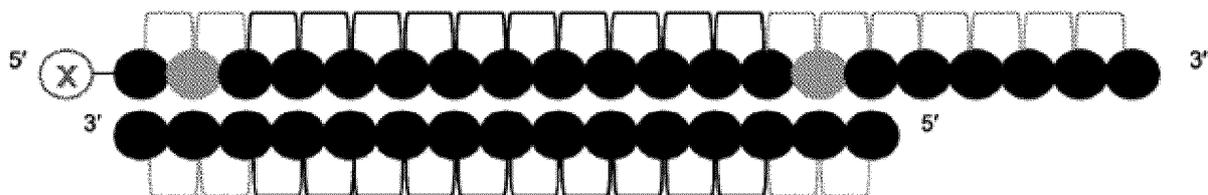


ФИГ. 3D

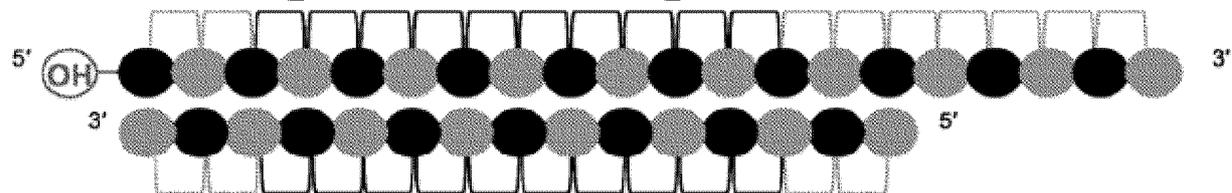
2'-OMe Богатый sFLT1- i13_2283



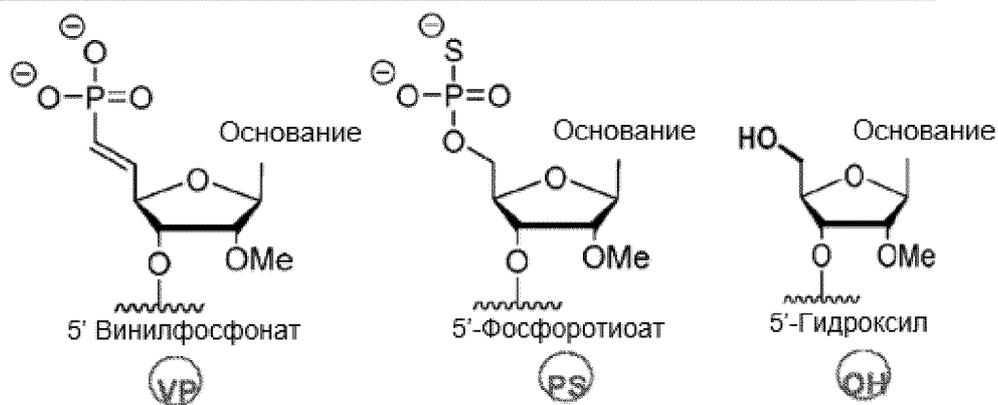
2'-OMe Богатый sFLT1- e15a_2519



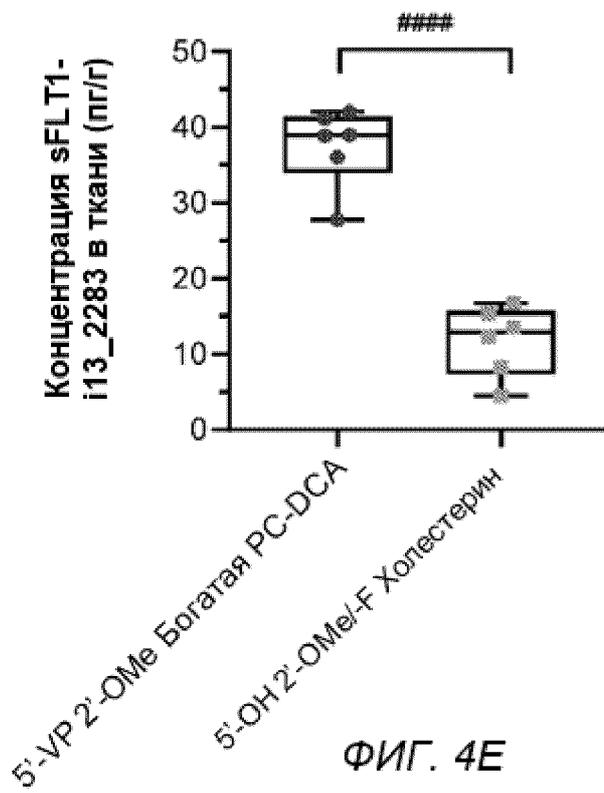
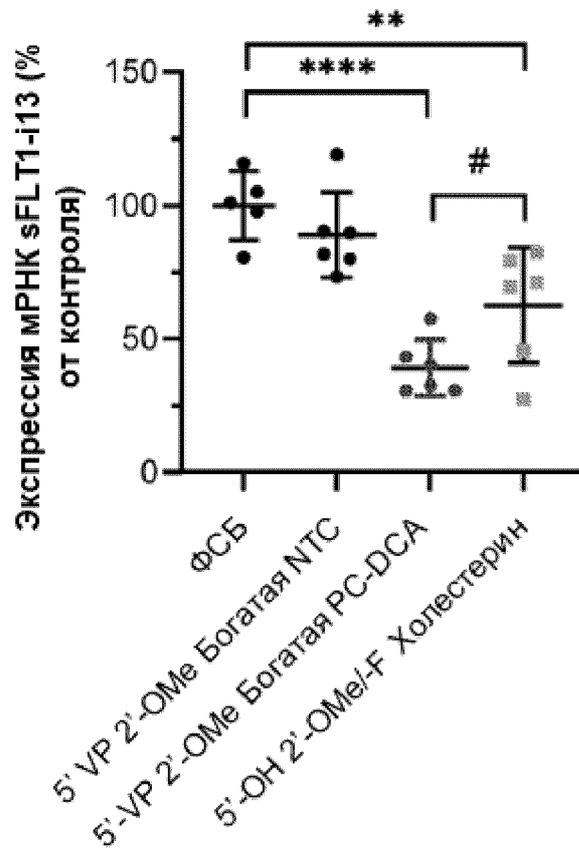
2'-OMe/-FsFLT-i13_2283 и 2'-OMe/-F sFLT-e15a_2519

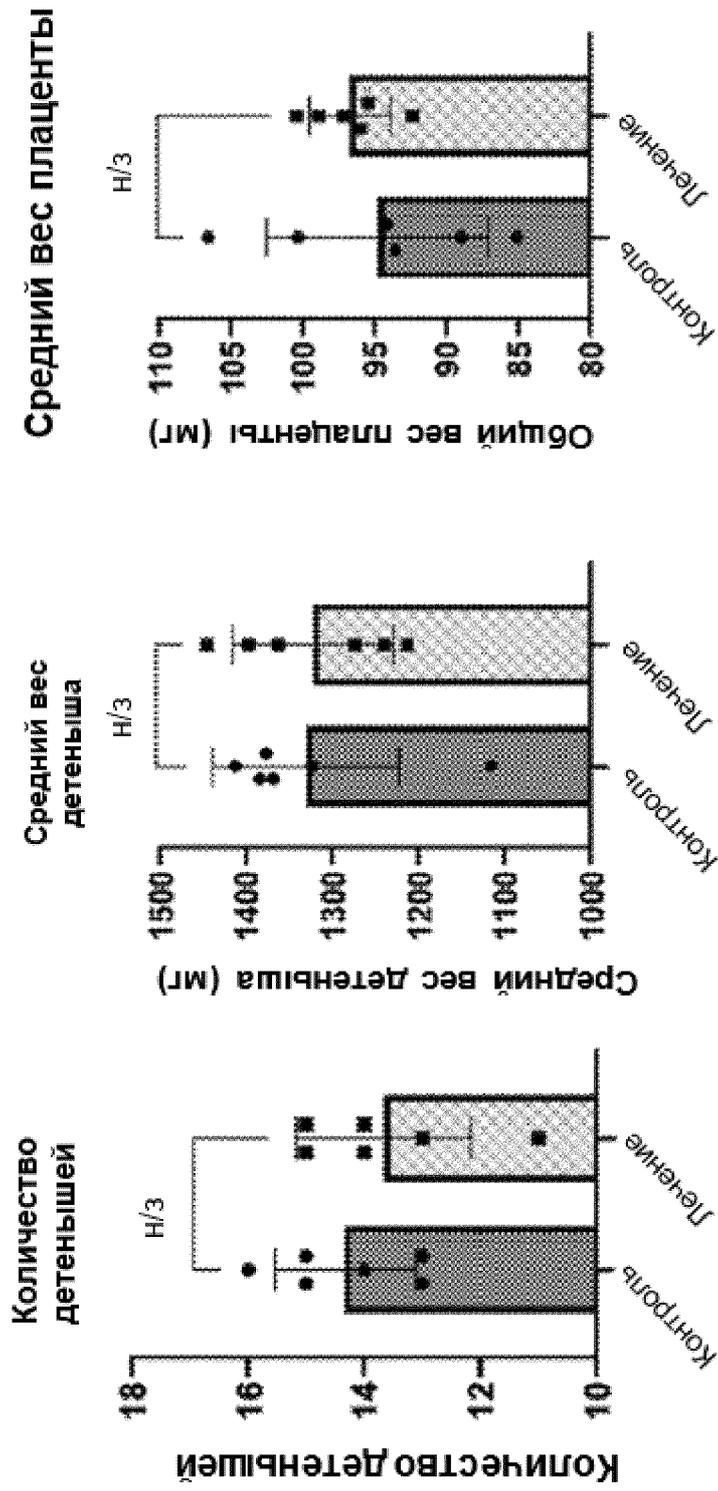


5'-конец антисмысловой цепи

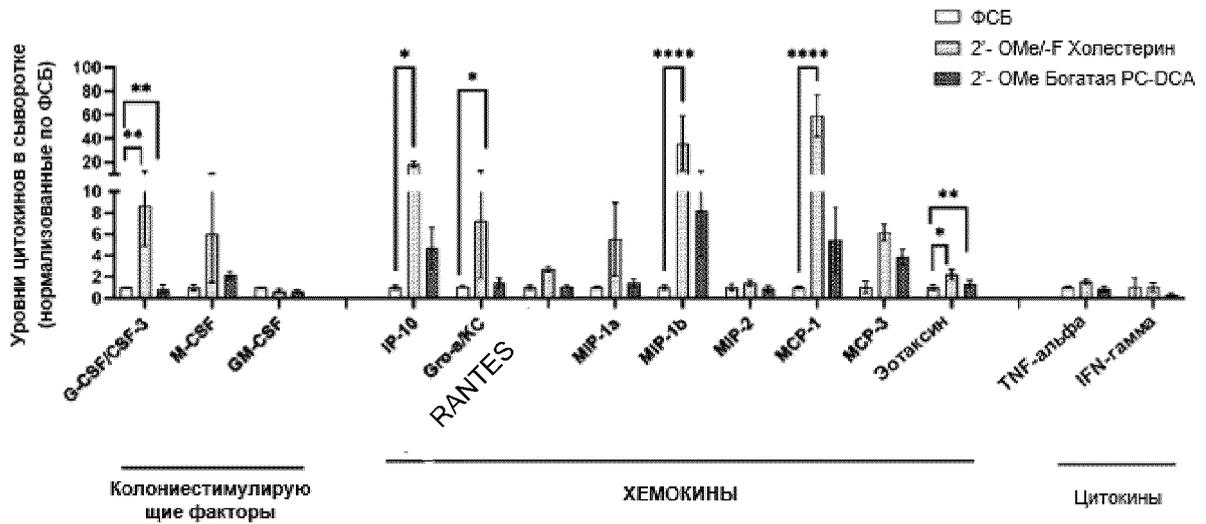
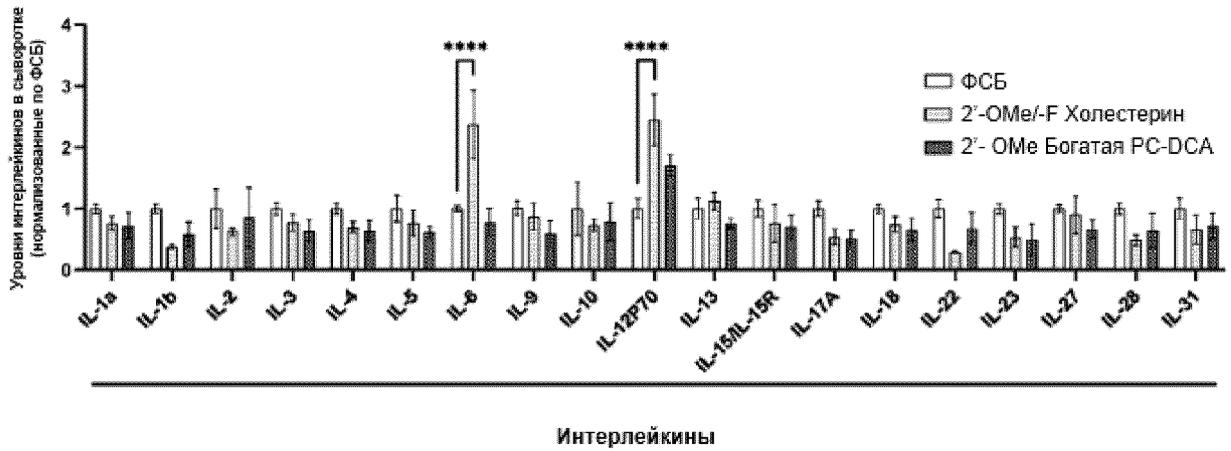


ФИГ. 4А



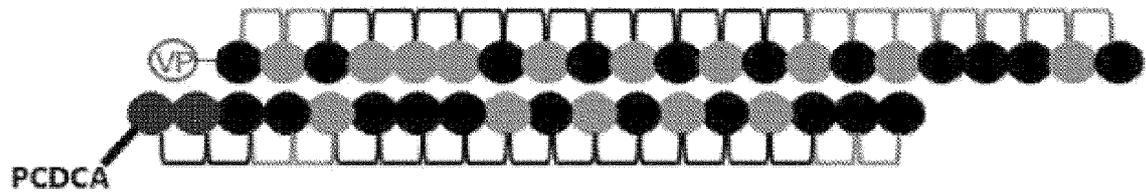


ФИГ. 4F



ФИГ. 5

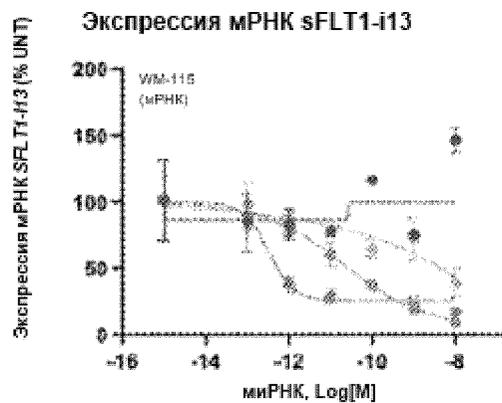
sFLT-2283/sFLT-2519



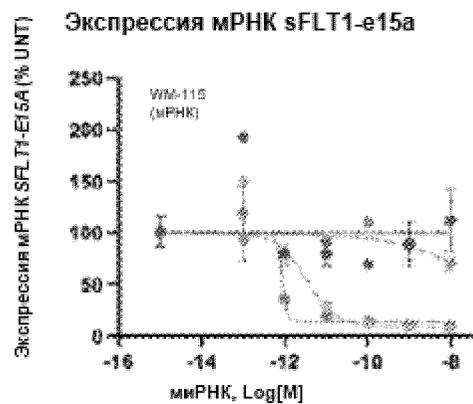
● dT ДНК ● 2'-O-Метил ● 2'-Фтор □ Фосфоротиоат □ Фосфодиэфир ⊕ (E)-5'-Винилфосфонат Фосфохолин-докозановая кислота (PCDCA)

sFLT_2283_антисмысловая	UAAAUUUGGAGAUCCGAGAGA
sFLT_2283_смысловая	CGGAUCUCCAAAUUUA
sFLT_2519_антисмысловая	UAUAAAUGGUAGCUAUGAUGA
sFLT_2519_смысловая	AUAGCUACCAUUUAUA

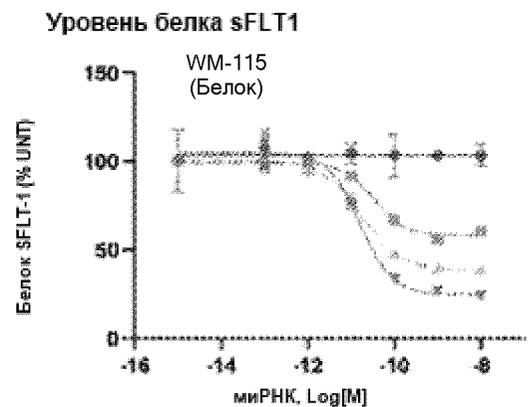
ФИГ. 6



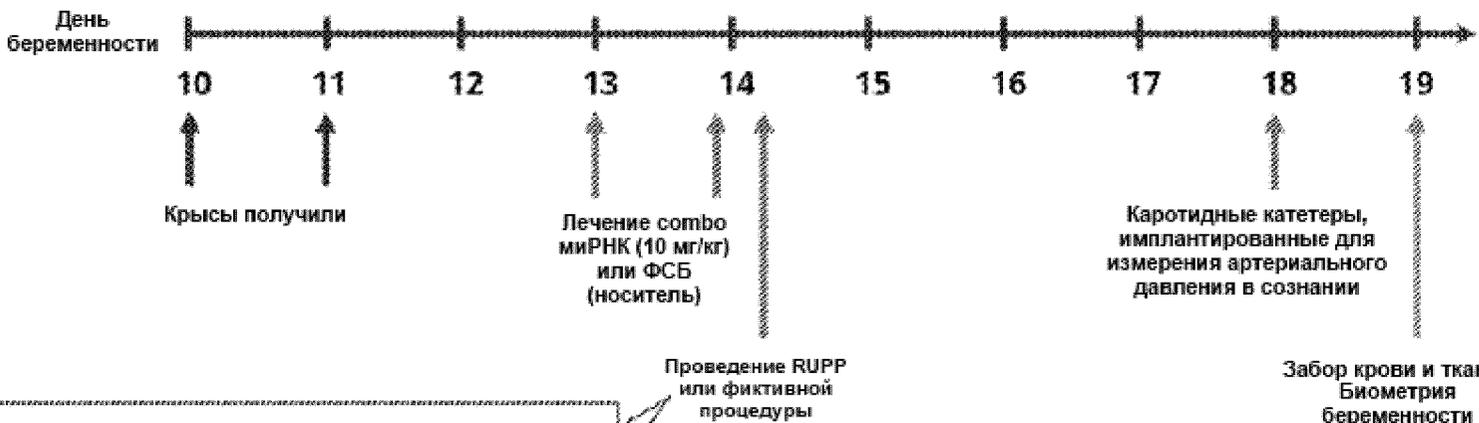
- NTC (нецелевой контроль)
- МиРНК-2283 (нацелена SFLT1-i13) — IC₅₀ 21,41 pM
- МиРНК-2519 (нацелена SFLT1-E15A) — IC₅₀ NA
- COMBO (1:1 миРНК-2283 | миРНК-2519) — IC₅₀ 0,32 pM



- NTC (нецелевой контроль)
- МиРНК-2283 (нацелена SFLT1-i13) — IC₅₀ 22,4 pM
- МиРНК-2519 (нацелена SFLT1-E15A) — IC₅₀ 3,36 pM
- COMBO (1:1 миРНК-2283 | миРНК-2519) — IC₅₀ 0,88 pM



- NTC (нецелевой контроль)
- МиРНК-2283 (нацелена SFLT1-i13) — IC₅₀ 33,7 pM
- МиРНК-2519 (нацелена SFLT1-E15A) — IC₅₀ 17,4 pM
- COMBO (1:1 миРНК-2283 | миРНК-2519) — IC₅₀ 16,23 pM

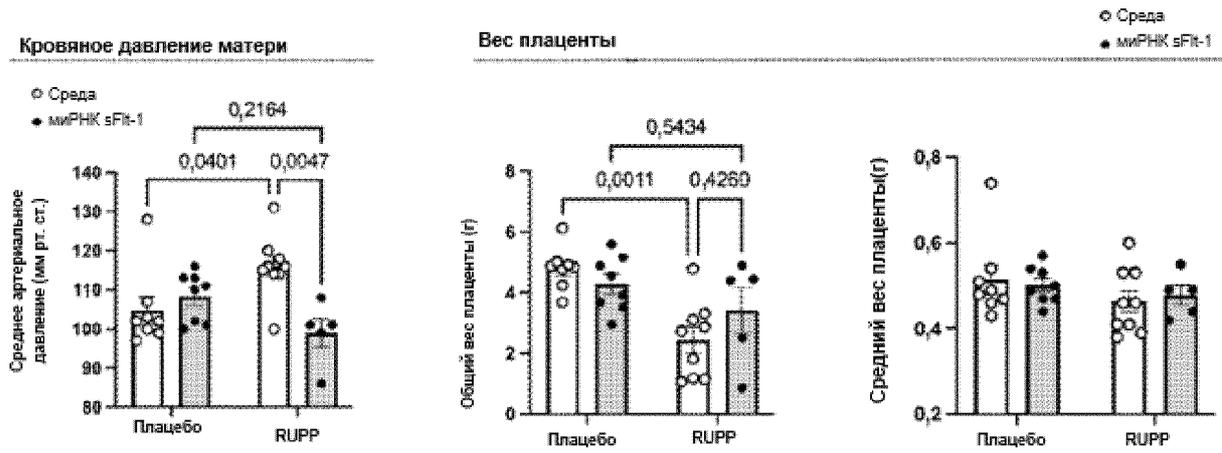


У крыс RUPP наблюдаются характерные симптомы преэклампсии:

- Повышение среднего артериального давления (MAP) у матери
- Снижение скорости клубочковой фильтрации (GFR)
- Повышенные уровни sFLT1

*RUPP: Модель сниженной маточно-плацентарной перфузии у беременных крыс.

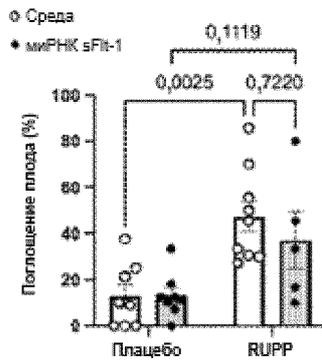
ФИГ. 8А



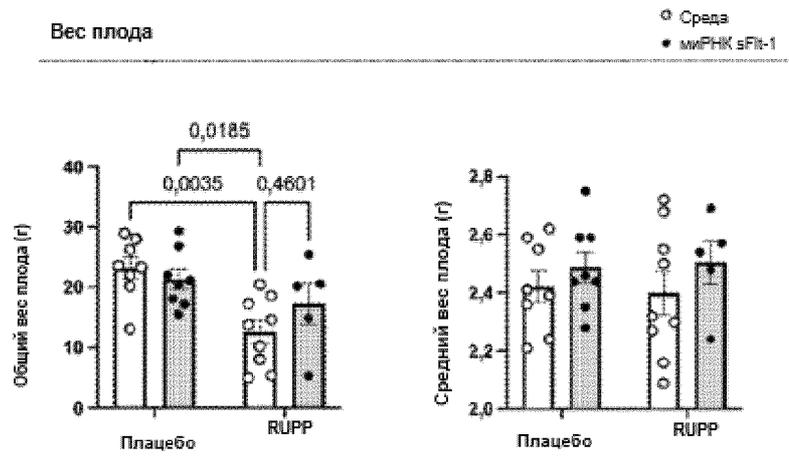
миРНК *sFLT-1 Комбинация (смесь 1:1 миРНК-2283 (нацеливание на sFLT1-i13' и миРНК-2510 (нацеливание на sFLT1-e1)

ФИГ. 8В

Поглощение плода



Вес плода

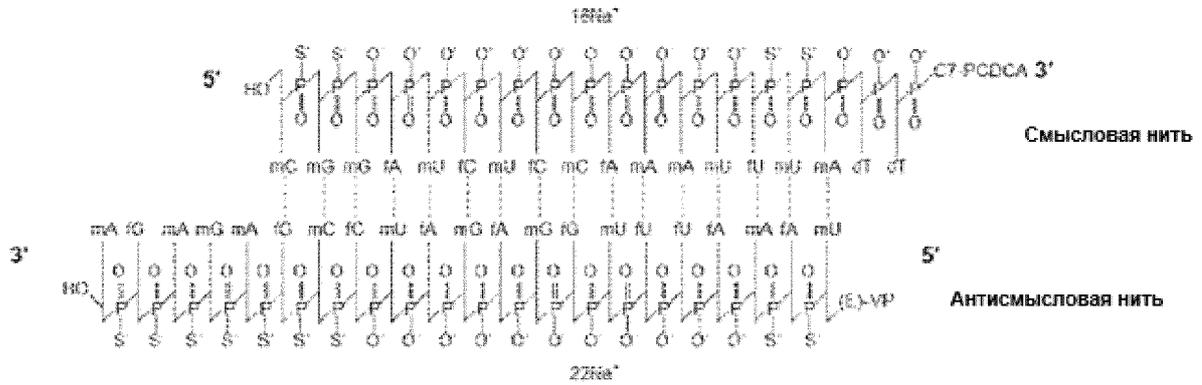


миРНК sFLT-1 Комбинация (смесь 1:1 миРНК-2283 (нацеливание на sFLT1-i13) и миРНК-2519 (нацеливание на sFLT1-e1))

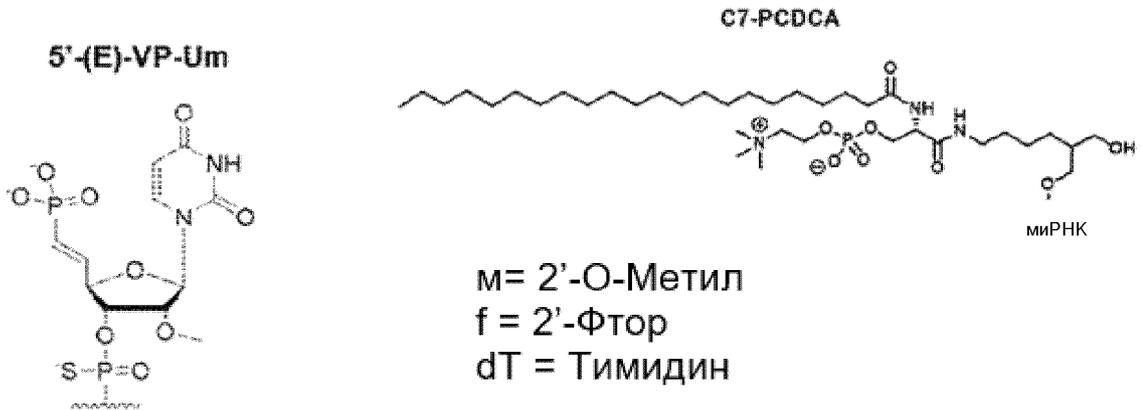
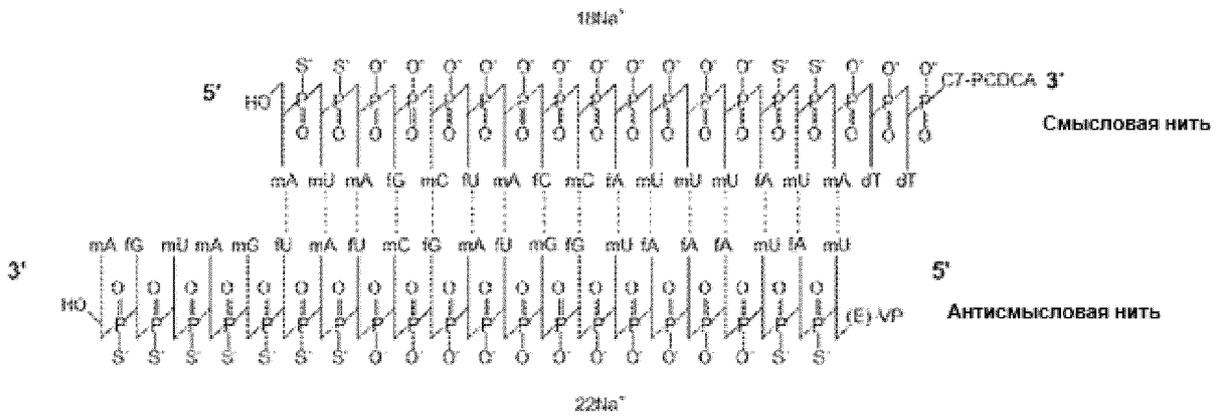
ФИГ. 8С

17/21

sFLT-2283



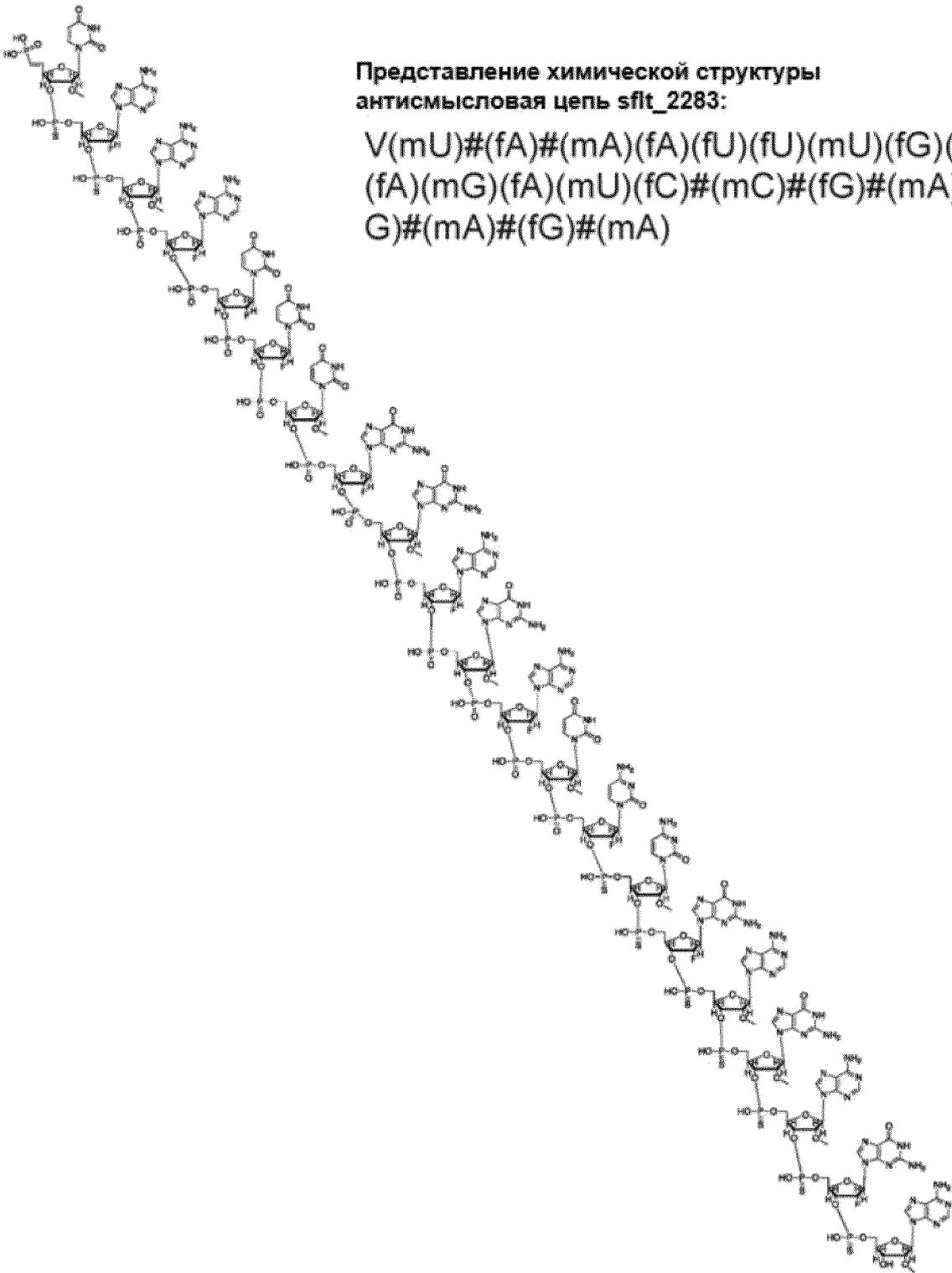
sFLT-2519



ФИГ. 9

Представление химической структуры
антисмысловая цепь sflt_2283:

V(mU)#(fA)#(mA)(fA)(fU)(fU)(mU)(fG)(mG)
(fA)(mG)(fA)(mU)(fC)#(mC)#(fG)#(mA)#(m
G)#(mA)#(fG)#(mA)



ФИГ. 10А

Представление химической структуры
смысловая цепь sflt_2283:

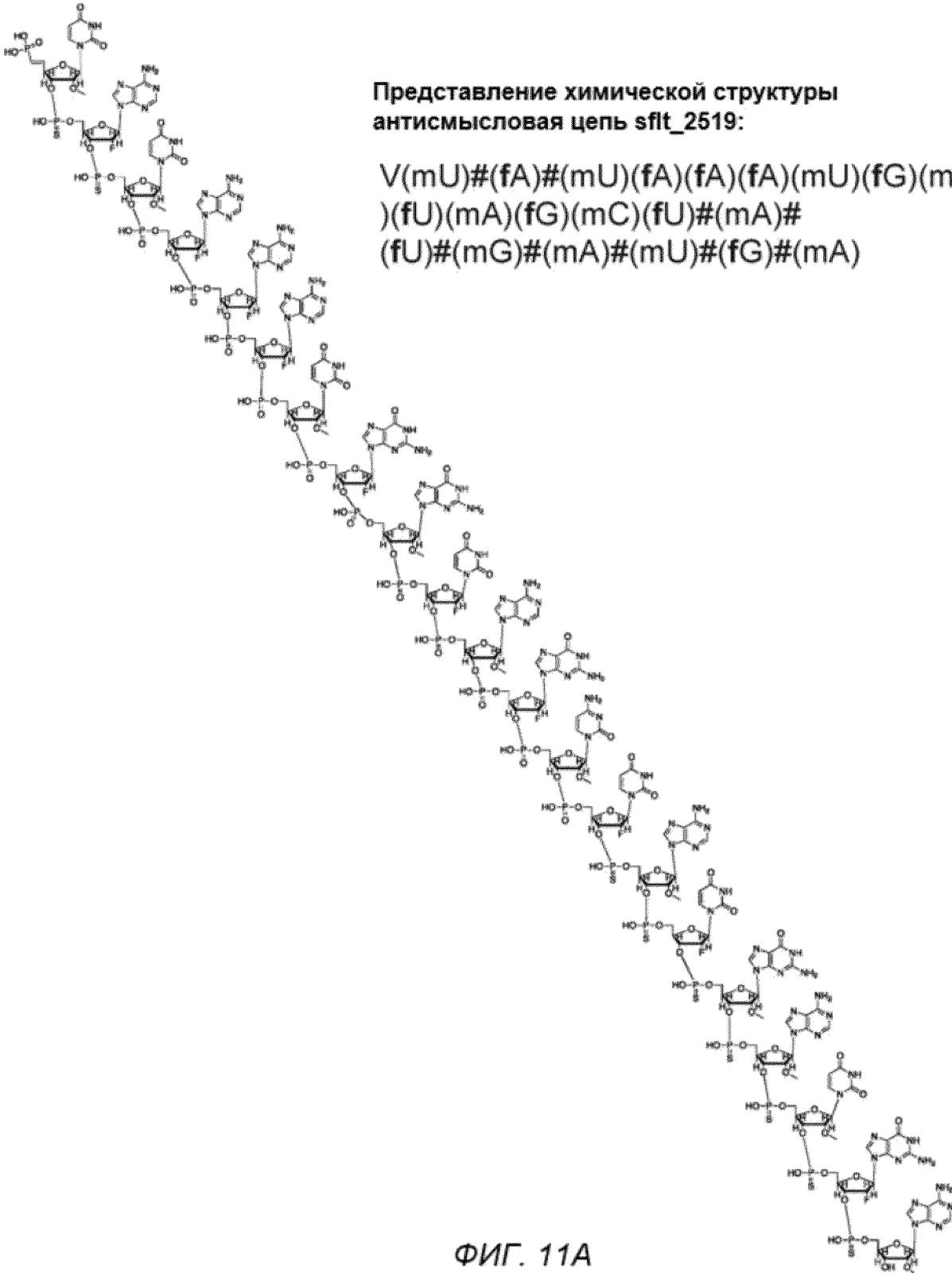
(mC)#(mG)#(mG)(fA)(mU)(fC)(mU)(fC)(mC)(
fA)(mA)(mA)(mU)(fU)#(mU)#(mA)(T)(T)-
PCDCA



ФИГ. 10В

Представление химической структуры
антисмысловая цепь sflt_2519:

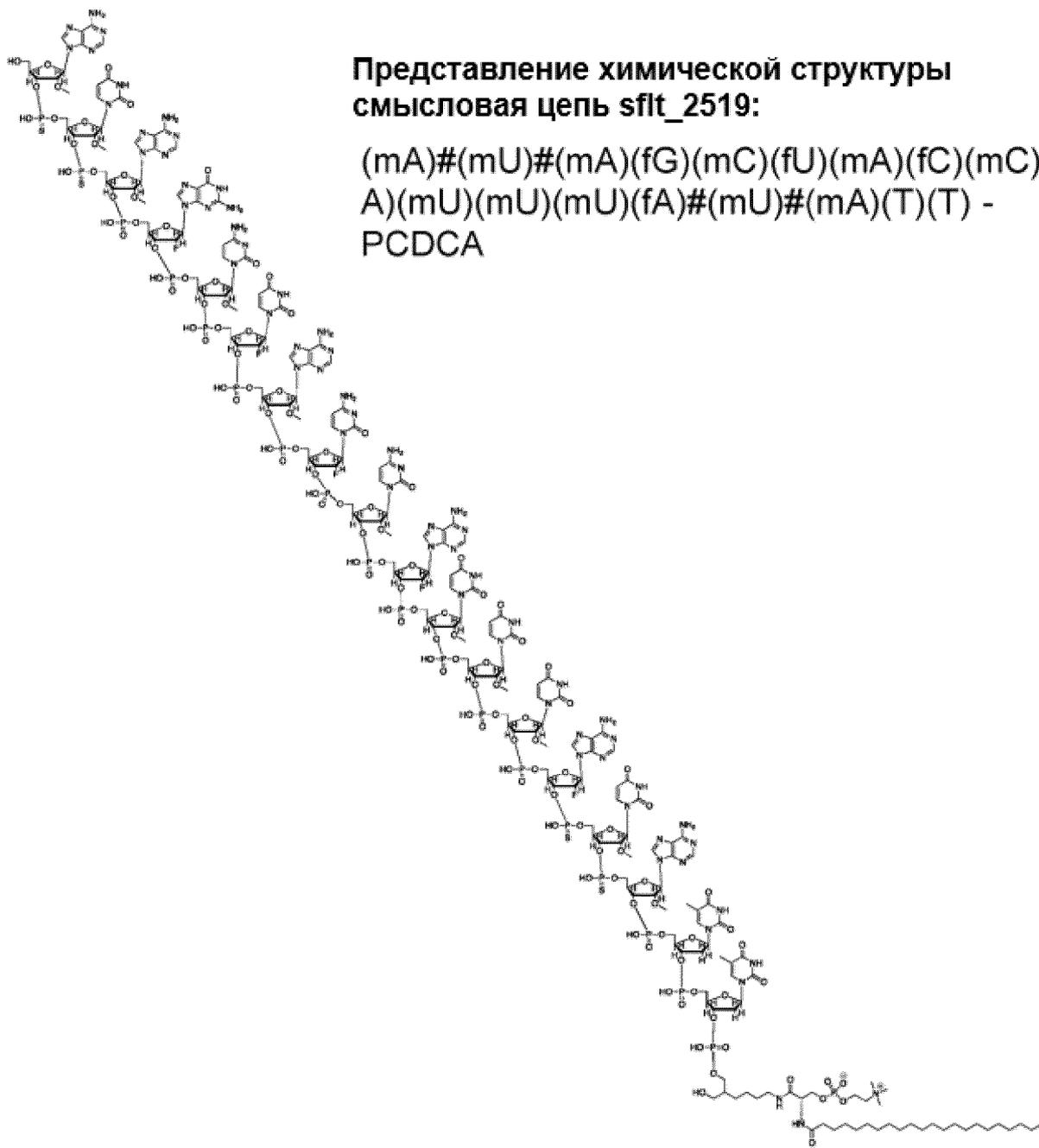
V(mU)#(fA)#(mU)(fA)(fA)(fA)(mU)(fG)(mG)
) (fU)(mA)(fG)(mC)(fU)#(mA)#
(fU)#(mG)#(mA)#(mU)#(fG)#(mA)



ФИГ. 11А

Представление химической структуры
смысловая цепь sflt_2519:

(mA)#(mU)#(mA)(fG)(mC)(fU)(mA)(fC)(mC)(f
A)(mU)(mU)(mU)(fA)#(mU)#(mA)(T)(T) -
PCDCA



ФИГ. 11В